

• 方药研究 •

基于网络药理学的六味地黄丸治疗冠心病的分子机制研究*

杨志华¹, 刘 琰¹, 闫海峰¹, 姬艳苏², 王淑萍^{2△}

(1. 天津中医药大学, 天津 301617; 2. 武警特色医学中心, 天津 300162)

摘要: **目的** 运用网络药理学分析六味地黄丸治疗冠心病的分子机制。**方法** 从中药系统药理学分析平台(TCMSP)获得与六味地黄丸中 6 味中药相关的所有化学成分和作用靶点,运用 Cytoscape 3.2.1 软件构建化合物靶点相互作用网络图,利用 TTD、Drugbank、DisGeNET 数据库筛选冠心病相关的疾病靶点,将冠心病靶点与药物靶点进行 Venn 分析,筛选出二者的共同靶点,应用 STRING 平台构建蛋白-蛋白相互作用(PPI)网络模型。通过 DAVID (Version 6.8)数据库对疾病与药物共同靶点进行 Gene Ontology(GO)富集分析、KEGG 通路富集分析。**结果** 共筛选出六味地黄丸的 43 种主要成分及与治疗冠心病相关的关键靶点 85 个,靶点主要涉及调节脂多糖代谢、炎症反应、细胞分裂、细胞因子活性、DNA 复制及其转录等生物过程,通过参与 TNF、HIF-1、PI3K/Akt、Estrogen、TLRs、NF- κ B、cGMP-PKG、cAMP 等信号通路治疗冠心病。**结论** 本研究从多角度探索了六味地黄丸治疗冠心病可能的作用机制,揭示了六味地黄丸具有多成分、多靶点和多途径治疗疾病的特点,为其临床应用及进一步研究其药效作用机制奠定基础。

关键词: 六味地黄丸;冠心病;网络药理学;分子机制;生物过程;信号通路

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1000-2723(2019)03-0074-09

DOI: 10.19288/j.cnki.issn.1000-2723.2019.03.013

Molecular Mechanism of Liuwei Dihuang Pills in Treating Coronary Heart Disease Based on Network Pharmacology

YANG Zhihua¹, LIU Yan¹, YAN Haifeng¹, JI Yansu², WANG Shuping²

(1. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617, China;

2. Characteristic Medical Center of PAP, Tianjin 300162, China)

ABSTRACT: Objective Using network pharmacology to analyze the molecular mechanism of Liuwei Dihuang Pills in treating coronary heart disease. **Methods** Obtained all chemical constituents and targets related to 6 traditional Chinese medicines in Liuwei Dihuang Pills from the Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology Analysis Platform (TCMSP). Cytoscape 3.2.1 software was used to construct a network map of compound target interactions. TTD, Drugbank, and DisGeNET databases were used to screen coronary heart disease-related disease targets. Venn analysis of coronary heart disease targets and drug targets were performed to screen out the common targets. Protein-protein interaction (PPI) network model was constructed by STRING platform. Gene Ontology (GO) enrichment analysis and KEGG pathway enrichment analysis of common targets of diseases and drugs were conducted by DAVID (Version 6.8) database. **Results** A total of 43 major components of Liuwei Dihuang Pills and 85 key targets related to the treatment of coronary heart disease were screened. The targets are mainly related to the regulation of lipopolysaccharide metabolism, inflammatory reaction, cell division, cytokine activity, DNA replication and transcription. Treatment coronary heart disease by participating in TNF, HIF-1, PI3K/Akt, Estrogen, TLRs, NF- κ B, cGMP-PKG, cAMP and other signaling pathways. **Conclusion** This study explored the possible mechanism of Liuwei Dihuang Pills in the treatment of coronary heart disease from various perspectives, and revealed that

收稿日期: 2019-04-03

* 基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目(81903839)

第一作者简介: 杨志华(1989-),男,在读硕士研究生,研究方向:从事中医内科心血管研究。

△通信作者: 王淑萍, E-mail: wangshuping10 @163.com

Liuwei Dihuang Pills has the characteristics of multi-component, multi-target and multi-channel treatment of diseases, laying a foundation for its clinical application and further study of its pharmacodynamic mechanism.

KEY WORDS: Liuwei Dihuang Pills; coronary heart disease; network pharmacology; molecular mechanisms; biological processes; signaling pathway

冠心病是我国最常见的心血管疾病之一, 归属中医学“胸痹”“真心痛”的范畴, 临床多以胸背痛、胸中窒闷、心悸、气短为主要表现。流行病学调查显示, 我国冠心病人数高达1 100万, 且死亡率呈上升趋势^[1]。本病的发生多与外感寒邪、饮食不节、情志失调、劳倦内伤、年老体虚等因素有关^[2], 好发于40岁以上的中老年人^[3], 《素问·阴阳应象大论》中记载: “年四十, 而阴气自半也, 起居衰矣。” 人至中年, 肾气自半、精血渐衰、肾阴亏虚, 不能濡养五脏之阴, 心脉失于濡养而发为胸痹, 肾阴虚是冠心病发生发展的重要病理基础^[4]。

六味地黄丸原名“地黄丸”, 被誉为“补阴方药之祖”, 首载于宋·钱乙《小儿药证直诀》, 系钱乙从《金匱要略》的肾气丸中减去桂枝、附子而成, 由熟地黄、山茱萸、山药、牡丹皮、泽泻、茯苓6味药物组成, 具有填精滋阴补肾之功效, 主治肾阴不足证^[5]。有医家从肾论治冠心病, 运用六味地黄丸加减治疗冠心病取得很好的临床疗效^[6-9]。由于中药及其复方具有多成分、多靶点、多通路协同作用的特点, 这种复杂性使其作用机制不明确。网络药理学是指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, 从而理解药物和机体相互作用的科学^[10], 从整体观角度认识药物与疾病间的相互作用^[11]。本文通过运用网络药理学探讨六味地黄丸治疗冠心病的药物成分及可能的分子作用途径, 通过建立“药物成分-靶点-通路”之间的关系, 分析该方治疗冠心病的作用机制, 以期为冠心病相关的基础实验研究及六味地黄丸的临床合理应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 六味地黄丸活性成分的筛选 运用中药系统药理学数据库和分析平台(TCMSP, <http://tcmssp.com/tcmssp.php>)筛选六味地黄丸全方中熟地黄、山茱萸、山药、茯苓、泽泻、牡丹皮的所有化学成分, 建立六味地黄丸全方中药化学成分数据库。药物在人体内要经过吸收、分布、代谢和排泄(ADME)过程才能到达靶器官发挥其治疗作用, 基于口服生物利用度(oral-

bioavailability, OB)、类药性(Drug-likeness, DL)是筛选药物的关键参数, 以ADME参数中的 $OB \geq 30\%$ 、类药性 $DL \geq 0.18$ ^[13-14]为限制条件进行初步筛选, 汇总结果、去除重复、删除没有相关信息的化学成分, 即为六味地黄丸治疗冠心病相关的生物活性成分。

1.2 六味地黄丸活性成分的潜在靶蛋白的收集及网络构建 根据已筛选的六味地黄丸全方中药活性成分, 通过TCMSP平台检索与候选化合物相关的潜在靶点, 并通过Uniprot数据库(<http://www.uniprot.org/>)将预测出的靶点蛋白名转换为基因名。将筛选的潜在靶点导入Cytoscape3.2.1软件, 构建6味中药及其化学成分、潜在靶点的网络可视化图。

1.3 冠心病相关靶点的筛选 利用TTD、Drugbank、DisGeNET数据库进行检索, 数据库以“coronary heart disease”为检索词, 收集与冠心病相关的靶点, 并删除假阳性和重复基因, 最终确定冠心病相关靶基因。

1.4 构建六味地黄丸治疗冠心病的相关网络图 采用Cytoscape3.2.1软件构建六味地黄丸治疗冠心病的相关网络图。将筛选的六味地黄丸的活性成分及其靶点导入Cytoscape 3.2.1软件, 构建“中药-化合物-靶点”网络。为明确六味地黄丸潜在靶点与冠心病相关靶点之间的相互作用, 将药物靶点与疾病靶点取交集, 筛选出六味地黄丸与冠心病的共同靶点, 通过Cytoscape3.2.1建立冠心病相关性的“化合物-靶点-冠心病”网络。其中的节点(node)代表化合物、靶蛋白或疾病, 边(edge)代表这些节点之间的互作关系, 即某个成分与靶点或靶点与疾病之间的联系。

1.5 蛋白-蛋白相互作用网络构建 将筛选到“疾病-药物成分”共同靶点导入String数据库(<https://string-db.org/>), 构建蛋白-蛋白相互作用网络, 将物种设置为“Homo sapiens”, 为确保数据的可靠性, 蛋白最低相互作用阈值设为“highest confidence”(>0.9), 对蛋白相互作用进行筛选, 将结果保存成TSV格式, 保留文件中node1、node2和Combined score数据并导入Cytoscape3.2.1软件, 分析蛋白相互作用网络。

1.6 GO功能富集分析和KEGG通路富集分析 生物学信息注释数据库(DAVID, <https://david.ncicfcrf.gov/summary.jsp>, Version 6.8)^[12]是支持大规模的基因/靶蛋白列表分析的稳定网络数据库,能够找出最显著富集的生物学注释,被用来进行GO生物过程富集分析和KEGG代谢通路富集分析,以进一步研究六味地黄丸治疗冠心病靶蛋白群的协同作用情况。将药物与冠心病共同靶点导入DAVID数据库,对共同靶点进行GO富集分析和KEGG通路分析,设定阈值 $P < 0.05$,筛选排名靠前的生物过程或通路。

2 结果

2.1 六味地黄丸的活性成分筛选与ADME分析 本研究通过TCMSP数据库对六味地黄丸6味中药已报道的化学成分进行检索,共收集以 $OB \geq 30\%$ 、 $DL \geq$

0.18为参数进行初步筛选,结果为熟地黄2个,山茱萸20个,山药16个,茯苓15个,泽泻10个,牡丹皮11个,删除重复成分5个,剔除没有相关信息成分26个,共有43个入血活性成分有良好的口服生物利用度和类药性,见表1。将药物成分及作用靶点导入Cytoscape 3.2.1软件进行可视化分析,见图1。共包括6味中药,43种化学成分,208个潜在靶点。椭圆节点代表靶点,三角形节点代表化学成分,八边形节点代表中药。水绿色、红色、浅蓝色、黄色、绿色、紫色三角形节点分别代表熟地黄、山茱萸、山药、泽泻、茯苓、牡丹皮的化学成分。Sitosterol(谷甾醇)是熟地黄、山茱萸、牡丹皮、泽泻4味中药共有的化学成分,stigmasterol(豆甾醇)是熟地黄、山茱萸、山药3味中药共有的化学成分。

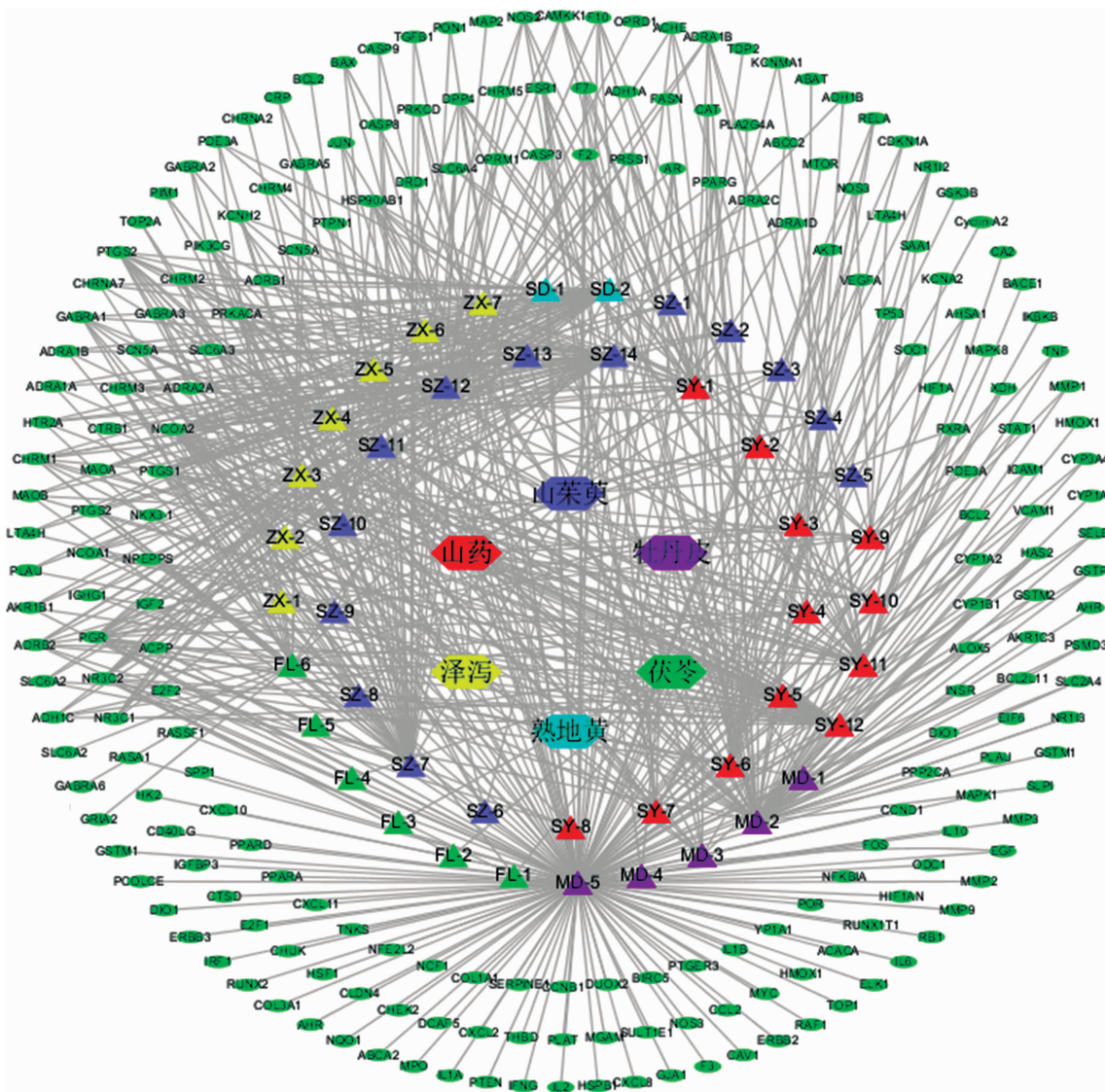


图1 六味地黄丸-化合物-靶点相互作用网络

表1 六味地黄丸活性化合物信息

序号	PubChem CID	化合物	分子式	分子质量	OB%	DL	来源
SD-1、SZ-1、MD-1、ZX-1	12303645	谷甾醇(sitosterol)	C ₂₉ H ₅₀ O	414.718	36.9	0.8	熟地黄、山茱萸、牡丹皮、泽泻
SD-2、SZ-2、SY-1	5280794	豆甾醇(stigmasterol)	C ₂₉ H ₄₈ O	412.702	43.8	0.8	熟地黄、山茱萸、山药
SZ-3	5282184	十八碳二烯(mandenol)	C ₂₀ H ₃₆ O ₂	308.506	42	0.2	山茱萸
SZ-4	6371716	亚麻酸(ethyl linolenate)	C ₂₀ H ₃₄ O ₂	306.49	46.1	0.2	山茱萸
SZ-5	457801	poriferast-5-en-3beta-ol	C ₂₉ H ₅₀ O	414.718	36.9	0.8	山茱萸
SZ-6	33934	邻苯二甲酸二异辛酯(diop)	C ₂₄ H ₃₈ O ₄	390.564	43.6	0.4	山茱萸
SZ-7	5363269	油酸乙酯(ethyl oleate)	C ₂₀ H ₃₈ O ₂	310.522	32.4	0.2	山茱萸
SZ-8	442659	白花苷(leucanthoside)	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₁	462.407	32.1	0.8	山茱萸
SZ-9	222284	β-谷甾醇(β-sitosterol)	C ₂₉ H ₅₀ O	414.718	36.9	0.8	山茱萸
SZ-10	5366013	2,6,10,14,18-pentamethylcosa-2,6,10,14,18-pentaene	C ₂₅ H ₄₂	342.67	33.4	0.2	山茱萸
SZ-11	46191017	cornudentanone	C ₂₂ H ₃₄ O ₅	378.509	39.7	0.3	山茱萸
SZ-12	5318214	羟基芫花素(hydroxygenkwanin)	C ₁₆ H ₁₂ O ₆	300.266	36.5	0.3	山茱萸
SZ-13	259991	三羟基蟾蜍二烯羧酸内酯(telocinobufagin)	C ₂₄ H ₃₄ O ₅	402.531	70	0.8	山茱萸
SZ-14	72340	四氢鸭脚木碱(tetrahydroalstonine)	C ₂₁ H ₂₄ N ₂ O ₃	352.434	32.4	0.8	山茱萸
FL-1	10743008	A	C ₃₀ H ₄₆ O ₄	470.694	30.9	0.8	茯苓
FL-2	12309443	氢化松苓酸B(trametenolic acid)	C ₃₀ H ₄₈ O ₃	456.711	38.7	0.8	茯苓
FL-3	10181133	酒酵母甾醇(cerevisterol)	C ₂₈ H ₄₆ O ₃	430.673	38	0.8	茯苓
FL-4	5283628	ergosta-7,22E-dien-3beta-ol	C ₂₈ H ₄₆ O	398.675	43.5	0.7	茯苓
FL-5	5351516	麦角固醇过氧化(ergosterol peroxide)	C ₂₈ H ₄₄ O ₃	428.657	40.4	0.8	茯苓
FL-6	73299	常春藤皂甙元(hederagenin)	C ₃₀ H ₄₈ O ₄	472.71	36.9	0.8	茯苓
ZX-2	14036809	泽泻醇B单乙酸酯(alisol B monoacetate)	C ₃₂ H ₅₀ O ₅	514.746	35.6	0.8	泽泻
ZX-3		16β-methoxyalisol B monoacetate	-	544.85	35.6	0.8	泽泻
ZX-4	15558620	泽泻醇B(alisol B)	C ₃₀ H ₄₈ O ₄	472.71	36.8	0.8	泽泻
ZX-5	14036813	泽泻醇C(alisol C monoacetate)	C ₃₂ H ₄₈ O ₆	528.73	33.1	0.8	泽泻
ZX-6	6436630	亚油酸单甘油酯(1-monolinolein)	C ₂₁ H ₃₈ O ₄	354.531	37.2	0.3	泽泻
ZX-7	14036811	B	C ₃₂ H ₅₀ O ₅	514.747	35.6	0.8	泽泻
SY-2	6443896	hancinone C	C ₂₃ H ₂₈ O ₆	400.471	59.1	0.4	山药
SY-3		24-Methylcholest-5-enyl-3beta-O-glucopyranoside_qt	-	400.76	37.6	0.7	山药
SY-4	173183	菜油甾醇(campesterol)	C ₂₈ H ₄₈ O	400.691	37.6	0.7	山药
SY-5	5281326	异岩藻酯醇(isofucosterol)	C ₂₉ H ₄₈ O	412.702	43.8	0.8	山药
SY-6		黄山药皂苷C(dioscoreside C_qt)	-	444.72	36.4	0.9	山药
SY-7	99474	薯蓣皂苷配基(diosgenin)	C ₂₇ H ₄₂ O ₃	414.63	80.9	0.8	山药
SY-8	5495928	AIDS180907	C ₂₃ H ₂₂ O ₆	394.423	45.3	0.8	山药
SY-9	5997	CLR	C ₂₇ H ₄₆ O	386.664	37.9	0.7	山药
SY-10	5320621	萆薢宁酰胺(piperlonguminine)	C ₁₆ H ₁₉ NO ₃	273.332	30.7	0.2	山药
SY-11	712316	花旗松素[(-)-taxifolin]	C ₁₅ H ₁₂ O ₇	304.254	60.5	0.3	山药
SY-12	122159	海风藤酮(kadsurenone)	C ₂₁ H ₂₄ O ₅	356.418	54.7	0.4	山药
MD-2	64971	丁香香萸(mairin)	C ₃₀ H ₄₈ O ₃	456.711	55.4	0.8	牡丹皮
MD-3	5280863	山奈酚(kaempferol)	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	286.239	41.9	0.2	牡丹皮
MD-4	9064	(+)-儿茶酸 [(+)-catechin]	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	290.271	54.8	0.2	牡丹皮
MD-5	2177166	5-[[5-(4-methoxyphenyl)-2-furyl]methylene] barbituric acid	C ₁₆ H ₁₂ N ₂ O ₅	312.281	43.4	0.3	牡丹皮
MD-6	5280343	槲皮苷(quercetin)	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	302.238	46.4	0.3	牡丹皮

注:A:(2R)-2-[(3S,5R,10S,13R,14R,16R,17R)-3,16-dihydroxy-4,4,10,13,14-pentamethyl-2,3,5,6,12,15,16,17-octahydro-1H-cyclopenta[a]phenanthren-17-yl]-6-methylhept-5-enoic acid

B:[(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

2.2 六味地黄丸中药与冠心病相关靶点网络构建与PPI网络构建 通过TTD、Drugbank、DisGeNET数据库进行检索,获得冠心病相关的靶点996个。将996个疾病靶点与208个药物成分靶点输入Venny 2.1软件绘制韦,得到二者共同靶点85个,A代表冠心病靶点,B代表六味地黄丸潜在靶点,见图2。通过Cytoscape3.2.1软件建立中药-靶点-疾病(traditional Chinese medicine-Target-Disease,C-T-D)网络图,见图3,共包括6味中药,1种疾病,85个靶点,最外层蓝色椭圆形节点代表共同靶点。将85个共同靶点输入STRING数据平台,分析PPI网络9(图4)。该网络由75个节点(10个节点未在网络中)、195条边组成。其中,节点的大小由自由度决定,自由度越大,节点越大。图中节点颜色根据自由度进行设定,颜色从绿色逐渐到红色的改变自由度逐渐增大,同一类的节点颜

色相近;边的粗细由介数决定,介数越大,边越粗。其中肿瘤坏死因子(Tumor necrosis factor,TNF,度=22)、苏氨酸蛋白激酶(threonine-protein kinase, AKT1,度=16)、白细胞介素6(Interleukin-6,IL6,度=15)、血管内皮生长因子A(Vascular endothelial growth factor A,VEGFA,度=14)、(Retinoic acid receptor RXR-alpha,RXRA,度=12)、白细胞介素8(In-

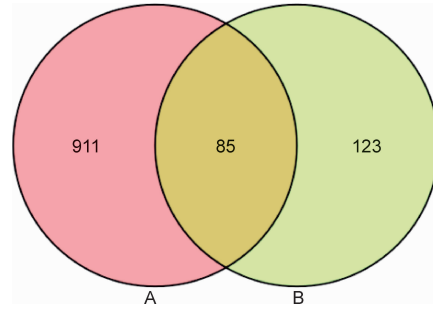


图2 冠心病靶点与六味地黄丸靶点 Venn图

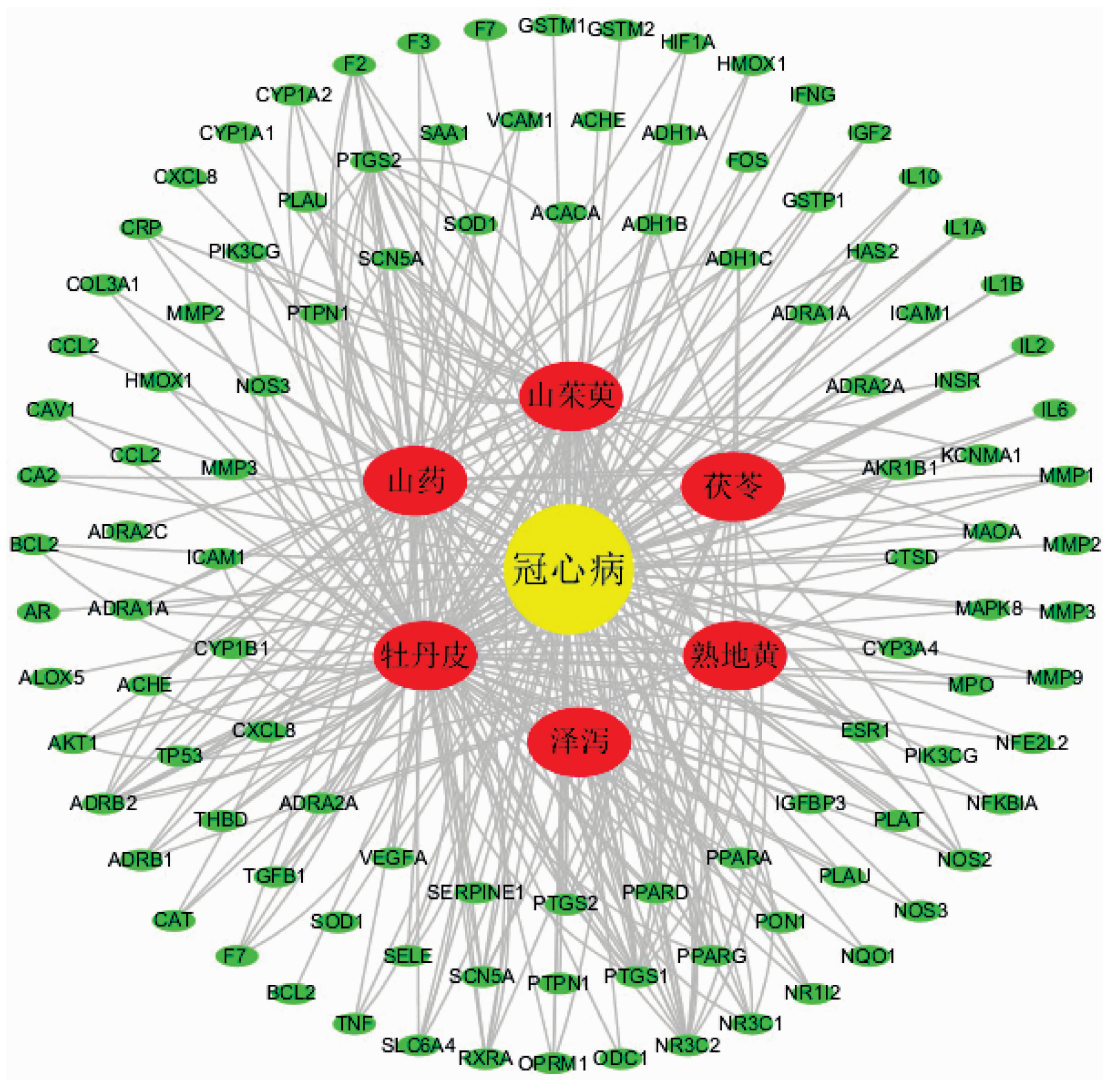


图3 六味地黄丸与冠心病共同靶点网络图

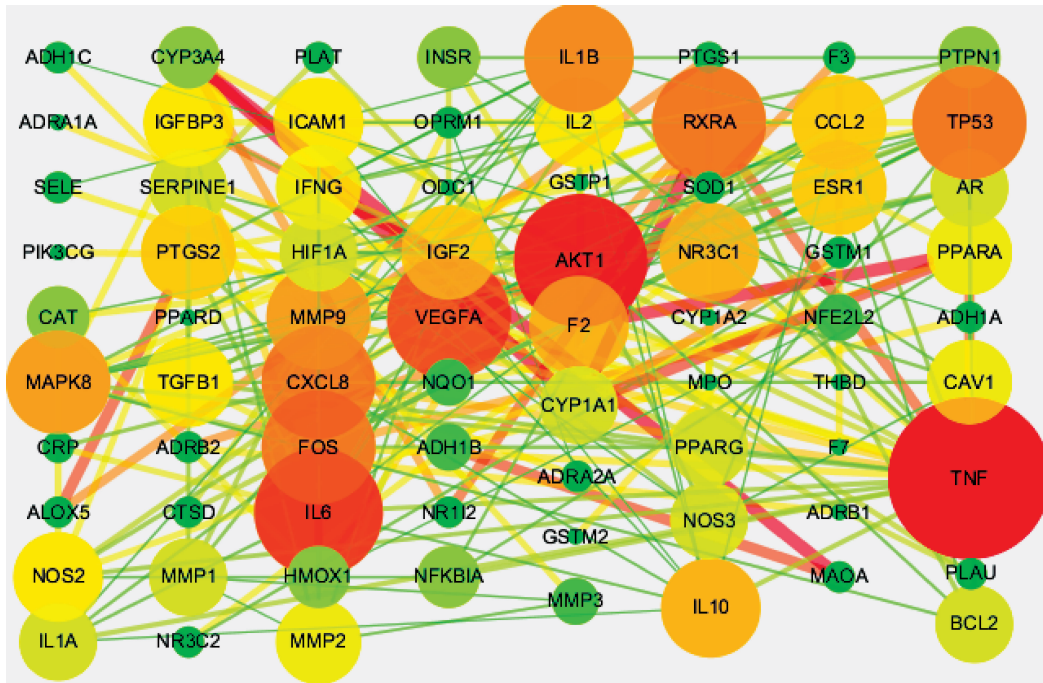


图 4 PPI 网络构建

terleukin-8, CXCL8, 度=12)、细胞肿瘤抗原 p53 (Cellular tumor antigen p53, TP53, 度=12)、原癌基因 c-Fos (Proto-oncogene c-Fos, FOS, 度=12) 等靶蛋白度值大, 与其他靶蛋白相互作用强, 在网络中发挥了关键作用。由此推测, 这些蛋白可能是六味地黄丸治疗冠心病的关键靶蛋白。

2.3 GO 生物学过程富集分析 对六味地黄丸治疗冠心病的相关靶点进行 GO 生物学过程分析, 取 *P* 值最小的前 20 个生物学过程, 见表 2。GO 生物学过程富集分析结果提示, 39 个靶点参与细胞组分 (45.9%), 13 个靶点参与了信号通路传导 (15.3%), 8 个参与了炎症反应 (9.4%), 13 个靶点参与了 RNA 聚

表 2 GO 功能富集分析

类型	编号	作用途径	<i>P</i> 值	基因数目
细胞组分	GO:0005615	extracellular space	1.91×10^{-12}	25
分子功能	GO:0020037	heme binding	4.91×10^{-7}	9
分子功能	GO:0043565	sequence-specific DNA binding	1.80×10^{-6}	12
生物过程	GO:0031663	lipopolysaccharide-mediated signaling pathway	4.23×10^{-6}	5
分子功能	GO:0042802	identical protein binding	4.97×10^{-6}	6
细胞组分	GO:0031012	extracellular matrix	1.17×10^{-5}	7
生物过程	GO:0051781	positive regulation of cell division	1.43×10^{-5}	5
生物过程	GO:0045944	positive regulation of transcription from RNA polymerase II promoter	1.65×10^{-5}	13
生物过程	GO:0044130	negative regulation of growth of symbiont in host	1.99×10^{-5}	4
分子功能	GO:0003707	steroid hormone receptor activity	2.17×10^{-5}	6
生物过程	GO:0001666	response to hypoxia	2.41×10^{-5}	6
生物过程	GO:0045766	positive regulation of angiogenesis	5.86×10^{-5}	6
生物过程	GO:0006351	transcription, DNA-templated	8.41×10^{-5}	10
生物过程	GO:0043401	steroid hormone mediated signaling pathway	1.29×10^{-4}	4
分子功能	GO:0005125	cytokine activity	1.34×10^{-4}	7
生物过程	GO:0033138	positive regulation of peptidyl-serine phosphorylation	1.38×10^{-4}	5
生物过程	GO:0006954	inflammatory response	1.74×10^{-4}	8
细胞组分	GO:0005829	cytosol	1.81×10^{-4}	14
生物过程	GO:0071880	adenylate cyclase-activating adrenergic receptor signaling pathway	2.57×10^{-4}	4
分子功能	GO:0051380	norepinephrine binding	2.63×10^{-4}	3

合酶 II 启动子调控 (15.3%), 6 个靶点参与了调控血管生成(7.1%), 12 个靶点参与了 DNA 复制(14.1%), 10 个靶点参与了 DNA 转录(11.8%)等。由此可知, 六味地黄丸可能通过调节多种生物过程治疗冠心病。

2.4 六味地黄丸 KEGG 代谢通路富集分析 利用 David 平台对筛选出的核心靶点进行 KEGG 通路富集分析, 共获得 90 条富集结果, 其中 $P < 0.01$, 与冠心病密切相关的前 20 条信号通路包括癌症通路、肿瘤

坏死因子(TNF)、缺氧诱导因子-1(HIF-1)、雌激素(Estrogen)、toll 样受体(TLRs)、磷脂酰肌醇 3-激酶-蛋白激酶(PI3K/Akt)、核因子(NF- κ B)、环鸟苷酸依赖的蛋白激酶(cGMP-PKG)、环磷酸腺苷(cAMP)、血管内皮生长因子(VEGF)、丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)等信号通路, 见表 3。这提示六味地黄丸通过作用于多条信号通路、多靶点来治疗冠心病, 且这些通路之间存在着复杂的相互作用关系。

表 3 靶点通路富集结果

Term	信号通路	基因数目	P 值
hsa04668	TNF signaling pathway	14	1.97E-10
hsa05200	Pathways in cancer	22	2.05E-09
hsa04066	HIF-1 signaling pathway	12	1.04E-08
hsa04620	Toll-like receptor signaling pathway	9	2.82E-05
hsa04621	NOD-like receptor signaling pathway	7	4.18E-05
hsa04064	NF-kappa B signaling pathway	8	6.10E-05
hsa04915	Estrogen signaling pathway	8	1.39E-04
hsa04660	T cell receptor signaling pathway	8	1.48E-04
hsa04210	Apoptosis	6	7.23E-04
hsa04068	FoxO signaling pathway	8	8.86E-04
hsa04920	Adipocytokine signaling pathway	6	0.0012573
hsa04060	Cytokine-cytokine receptor interaction	10	0.0019188
hsa04022	cGMP-PKG signaling pathway	8	0.0023014
hsa04370	VEGF signaling pathway	5	0.0053566
hsa04151	PI3K-Akt signaling pathway	11	0.0063436
hsa03320	PPAR signaling pathway	5	0.0074659
hsa04024	cAMP signaling pathway	8	0.0079281
hsa04152	AMPK signaling pathway	6	0.0139357
hsa04910	Insulin signaling pathway	6	0.021866
hsa04630	Jak-STAT signaling pathway	6	0.0264057
hsa04010	MAPK signaling pathway	8	0.0271927

3 讨论

冠心病是冠状动脉由于各种原因发生粥样硬化, 导致血管狭窄或闭塞, 使心肌缺血缺氧或坏死引起的心脏病, 也称缺血性心脏病。其主要危险因素包括高血压、血脂异常、糖尿病、肥胖和超重、吸烟、遗传因素等^[3], 近 10 余年我国冠心病发病率呈明显上升趋势^[15]。六味地黄丸是中医临床治疗冠心病的经典方, 现代药理研究表明, 熟地黄^[16]、山药^[17]具有抗氧化作用, 泽泻具有降血压、降血脂、降血糖、抗炎、抗氧化、保护血管内皮的功能^[18], 牡丹皮可以降血糖^[19]、保护心血管^[20-21], 山茱萸具有降血糖、降血脂的作用^[22], 茯苓具有抗炎作用^[23]。虽然对六味地黄丸 6 味中药主要成分的药理学作用已基本明确, 但作为复方研究其治疗冠

心病的潜在靶点和可能作用机制却鲜见报道。

本研究经过初步筛选得到 74 个六味地黄丸的生物活性成分, 剔除重复和没有相关信息的成分后最终获得 43 个生物活性成分, 对应成分靶点 208 个, 冠心病靶点 996 个, 二者共同靶点 85 个。通过对 85 个靶蛋白进行 PPI 分析发现, TNF、AKT1、IL6、VEGFA、RXRA、CXCL8、TP53、FOS 等靶蛋白度值大, 说明这些靶蛋白在六味地黄丸治疗冠心病过程中发挥着关键的作用, 揭示了六味地黄丸可能通过抗炎、抗氧化、保护血管内皮等多途径来治疗冠心病。

GO 富集分析结果显示, 六味地黄丸治疗冠心病主要涉及细胞分裂、氧化应激、物质代谢、DNA 复制及其转录等生物学过程, 蛋白、受体、转录因子、激素、

信号分子等多种物质参与,说明六味地黄丸治疗冠心病是一个十分复杂的生物学过程。

KEGG 通路富集分析结果显示,六味地黄丸治疗冠心病相关的信号通路包括 TNF、HIF-1、PI3K/Akt、Estrogen、TLRs、NF- κ B、cGMP-PKG、cAMP、VEGF 等。冠心病是一种复杂的慢性炎症性疾病,相关研究表明,炎症反应和免疫反应在冠心病的发生、发展及其预后过程中发挥着极其重要的作用^[24]。TNF- α 是人体内介导炎症反应、调节细胞和体液免疫的主要细胞因子,其血清水平可以反应机体炎症反应状况,TNF- α 与冠心病密切相关^[25],并且血清 TNF- α 水平与冠心病严重程度密切相关^[26]。缺氧诱导因子-1(HIF-1)是低氧状态下组织细胞产生的一种核蛋白,用于维持氧稳态的关键物质^[27],当心肌缺血缺氧时 HIF-1 α 表达增加,促进血管新生,增加心肌血供,对保护心肌具有重要意义^[28]。PI3K/Akt 信号通路具有广泛的生物学作用,参与调节细胞周期、能量代谢、物质合成等途径,是治疗冠心病、代谢紊乱等多种疾病的重要靶点^[29]。此外,PI3K/Akt 信号通路可通过抑制糖原合酶激酶-3(glycogen synthase, GSK-3)的活性,增加心肌对葡萄糖的摄取和脂代谢来实现保护心脏的作用^[30],韩军等^[31]通过激活 PI3K/Akt 信号通路,降低 IL-6、TNF- α 的活性,减轻炎症反应,保护心肌。Estrogen 可以通过调节脂质代谢、抑制炎症反应、减轻心肌缺血损伤及保护血管内膜等方面预防冠心病^[32],雌激素水平降低,心血管疾病和动脉粥样硬化进展的风险在绝经后显著增加^[33]。TLRs 是一种 I 型跨膜蛋白受体,能够介导天然免疫和获得性免疫反应,其介导炎症反应、调控免疫反应、参与细胞凋亡、斑块稳定性及血管重塑等动脉粥样硬化过程,与冠心病有密切的关系^[34]。核因子 κ B(NF- κ B)信号通路与冠心病的发生发展过程密切相关^[35],其在调节动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)的炎症反应中起关键作用,曹选超等^[36]发现 NF- κ B 高表达的患者可能存在严重的冠脉狭窄,NF- κ B 信号通路经多种刺激因子诱导后,在下游调节白细胞介素相关基因,凋亡抑制因子等多种基因的表达,不仅参与机体免疫调节、炎症反应及肿瘤等生理病理过程,还参与感染、细胞周期调控、细胞分化及凋亡等^[34]。现有的研究结果证明,cGMP-PKG 信号通路对于调控心血管系统的正常功能起着重要

的作用,其在调节血压、抑制动脉粥样硬化和抗再狭窄、抗血管损伤、调节调节血管平滑肌细胞的收缩和舒张、抑制心肌细胞肥大等方面发挥重要作用^[37-38]。cAMP 是传递生命信息的重要物质,与心肌细胞的抗缺血、抗氧化及抗损伤能力密切相关,其可增强心肌细胞收缩力,增加心输出量,在一定程度上减轻了心肌缺血^[39]。KEGG 通路富集结果提示,六味地黄丸可能通过抑制炎症反应、抗氧化应激、抗心肌缺血、保护血管内皮、调节脂代谢等途径治疗冠心病。

综上所述,本研究通过运用网络药理学方法,将网络数据库、药理学等多学科相结合,从系统生物学角度揭示六味地黄丸的中药药理作用,从多角度探索了六味地黄丸治疗冠心病的可能作用机制,预测了六味地黄丸治疗冠心病的潜在靶点和信号通路,为其临床应用及进一步验证其药理作用机制提供理论基础。

参考文献:

- [1] 胡盛寿,高润霖,刘力生,等.《中国心血管病报告 2018》概要[J]. 中国循环杂志,2019,34(3):209-220.
- [2] 吴勉华. 中医内科学[M]. 9 版. 北京:中国中医药出版社,2012:134-135.
- [3] 葛均波,徐永健. 内科学 [M]. 北京:人民卫生出版社,2013:227.
- [4] 毛静远. 阴虚与冠心病初探[J]. 中医药研究,1998(5):5-6.
- [5] 邓中甲. 方剂学 [M]. 2 版. 北京:中国中医药出版社,2010:164.
- [6] 王常普. 加用六味地黄丸加减治疗冠心病心绞痛 30 例[J]. 广西中医药,2015,38(4):27-28.
- [7] 李长月,孙兰军. 孙兰军从肾论治冠心病经验[J]. 河南中医,2011,31(12):1365-1366.
- [8] 刘征彦. 冠心病临床治验举隅 [J]. 现代医药卫生,2008(8):1216-1217.
- [9] 任寿山,云文清. 冠心病从肾论治体会[J]. 内蒙古中医药,2000(S1):25-26.
- [10] 周文霞,程肖蕊,张永祥. 网络药理学:认识药物及发现药物的新理念 [J]. 中国药理学与毒理学杂志,2012,26(1):4-9.
- [11] LIU C X, LIU R, FAN H R, et al. Network pharmacology bridges traditional application and modern development of traditional Chinese medicine[J]. Chin Herb Med, 2015,7(1):3-17.

- [12] MERING C V, JENSEN L J, SNEL B, et al. STRING: known and predicted protein-protein associations, integrated and transferred across organisms[J]. *Nucleic Acids Res*, 2005, 33: 433-437.
- [13] BIJLSMA J W, BERENBAUM F, LAFEBER F P. Osteoarthritis: an update with relevance for clinical practice [J]. *Lancet*, 2011, 377(9783): 2115-2126.
- [14] NGUYEN U S, ZHANG Y, ZHU Y, et al. Increasing prevalence of knee pain and symptomatic knee osteoarthritis: survey and cohort data[J]. *Ann Intern Med*, 2011, 155(11): 725-732.
- [15] 国家卫生计生委合理用药专家委员会, 中国药师协会. 冠心病合理用药指南(第2版)[J]. *中国医学前沿杂志(电子版)*, 2018, 10(06): 1-130.
- [16] 李乃谦. 熟地黄活性成分药理作用的研究进展 [J]. *中国处方药*, 2017, 15(01): 14-15.
- [17] 梁荣琰. 山药的药理学研究及现代化应用 [J]. *世界最新医学信息文摘*, 2015, 15(A3): 192-193.
- [18] 邢增智, 陈旺, 曾宇. 泽泻的化学成分与药理作用研究进展[J]. *中医药导报*, 2017, 23(15): 75-78.
- [19] 王松笛. 凤丹皮降血糖的活性成分研究[D]. 武汉: 湖北中医药大学, 2012.
- [20] LI H, XIE Y H, YANG Q, et al. Cardioprotective effect of paeonol and Danshensu combination on Isoproterenol-induced myocardial injury in rats[J]. *Plos One*, 2012, 7(11): e48872.
- [21] BAO M H, ZHANG Y W, ZHOU H H. Paeonol suppresses oxidized low-density lipoprotein induced endothelial cell apoptosis via activation of LOX-1/p38MAPK/NF- κ B pathway [J]. *Journal of ethnopharmacology*, 2013, 146(2): 543-551.
- [22] 陈巧霞, 杨光明, 潘扬. 山茱萸功能性成分的提取分离及生物活性研究进展[J]. *江苏中医药*, 2016, 48(1): 82-85.
- [23] 冯启光. 茯苓有效成分的药理学研究概况探析 [J]. *世界最新医学信息文摘*, 2015, 15(24): 179-180.
- [24] AGNIESZKA M, CHALUBINSKI M, MARLENA B, et al. Putative consequences of exposure to *Helicobacter pylori* infection in patients with coronary heart disease in terms of humoral immune response and inflammation[J]. *Archives of Medical Science*, 2016, 12(1): 45-54.
- [25] 吴春风, 姜焕好, 曾东良, 等. 银杏叶对冠心病患者血清 IL-6 和 TNF- α 的影响[J]. *广东医学*, 2010, 31(2): 235-236.
- [26] 李明强, 刘爱姣. 参麦注射液对冠心病心绞痛患者血清 TNF- α 和 IL-6 的影响[J]. *中国实用医药*, 2011, 6(17): 142-143.
- [27] 张瑞, 曹庆伟, 李爱平, 等. 基于网络药理学的黄芪抗疲劳作用机制研究[J]. *中草药*, 2019, 50(8): 1880-1889.
- [28] 赵爱华. 冠心病患者血清 HIF-1 α 及 HO-1 水平的变化及其意义[J]. *当代医学*, 2011, 17(9): 48.
- [29] 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.
- [30] 胡艳艳. PI3K/Akt/GSK-3 β 和线粒体 ATP 敏感钾通道介导原花青素对心肌缺血再灌注损伤的保护作用[D]. 济南: 山东大学, 2013.
- [31] 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.
- [32] 刘金龙, 张永和. 中药对冠心病的治疗作用及其机制探究[J]. *长春中医药大学学报*, 2019, 35(3): 589-592.
- [33] 赵元, 郑红霞, 徐颖, 等. 中药植物雌激素的研究进展[J]. *中国中药杂志*, 2017, 42(18): 3474-3487.
- [34] 李自青, 闫玉清, 张年萍, 等. Toll 样受体信号通路与冠心病关系的生物信息学分析[J]. *中国全科医学*, 2019, 22(17): 2069-2074.
- [35] 于泽胜, 李沛纯, 姚璐, 等. 基于 NF- κ B 信号转导通路的中医药干预冠心病研究进展 [J]. *中草药*, 2016, 47(9): 1614-1618.
- [36] 曹选超, 黄改荣, 王丽霞, 等. 冠心病患者外周血 NF- κ B 表达与冠脉危险积分的关系及意义[J]. *中国卫生检验杂志*, 2011, 21(9): 2202-2203.
- [37] FEIL R, LOHMANN S M, JONGE H, et al. Cyclic GMP-dependent protein kinases and the cardiovascular system: insights from genetically modified mice [J]. *Circulation Research*, 2003, 93(10): 907-916.
- [38] Hofmann F. The biology of cyclic GMP-dependent protein kinases[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2005, 280(1): 1-4.
- [39] 陈其敬, 张云波. 环磷酸腺苷、儿茶酚胺类物质水平在判断冠心病病情和预后方面意义[J]. *中国循证心血管医学杂志*, 2016, 8(9): 1059-1061.