

基于转录组学与网络药理学探讨心阳片防治慢性心力衰竭的机制

吴晗琴^{1,2}, 程如熹^{1,2}, 张璐^{1,2}, 何嘉琪^{1,2}, 陈鑫^{1,2}, 王陵军^{1,2,3} (1. 广州中医药大学, 广东 广州 510006; 2. 广州中医药大学第一附属医院, 广东 广州 510405; 3. 广州中医药大学岭南医学研究中心, 广东 广州 510405)

摘要: **目的** 基于转录组学与网络药理学探讨心阳片防治慢性心力衰竭(CHF)的关键机制。**方法** 将 32 只小鼠随机分为假手术组、模型组、心阳片组(910 mg·kg⁻¹)、培哌普利组(阳性对照组, 0.607 mg·kg⁻¹)。采用主动脉弓缩窄术(TAC)构建 CHF 小鼠模型。造模成功后, 按照上述剂量灌胃给药(10 mL·kg⁻¹), 每日 1 次, 连续给药 8 周。给药结束后, 对小鼠行心脏彩超检测, 采集左室射血分数(LVEF)及左室短轴缩短率(LVFS)等心功能指标; 采用 Masson 染色法观察心脏组织病理形态变化。取小鼠心脏组织提取 RNA 进行转录组测序, 并对组间差异基因进行 GO 功能及 KEGG 通路富集分析。通过 TCMSP 平台以及文献检索筛选心阳片的活性成分, 利用 SwissTargetPrediction 网站预测活性成分作用靶点。通过 Venny 平台对转录组测序得到的交集差异基因与活性成分作用靶点取交集, 获得交集靶点(心阳片治疗 CHF 的关键靶点)。利用 STRING 平台构建交集靶点蛋白互作(PPI)网络; 通过 Cytoscape 3.8.0 软件构建“中药-活性成分-关键靶点网络”网络, 筛选出心阳片防治 CHF 的核心靶点, 并对核心靶点进行 KEGG 通路富集分析; 采用 qPCR 法检测核心靶点 mRNA 表达。**结果** 与假手术组比较, 模型组小鼠的 LVEF、LVFS 均显著降低($P < 0.01$), 小鼠的心脏体积明显增大, 心脏系数显著升高($P < 0.01$), 心脏胶原容积分数明显升高($P < 0.05$)。与模型组比较, 给药组小鼠的 LVEF、LVFS 均显著升高($P < 0.01$), 小鼠的心脏体积明显缩小, 心脏系数显著降低($P < 0.01$); 心阳片组小鼠的心脏胶原容积分数明显下降($P < 0.05$), 培哌普利组的变化无明显差异($P > 0.05$)。共得到心阳片有效成分 83 个; 假手术组-模型组的差异基因与模型组-心阳片组差异基因的交集差异基因共有 354 个, 进一步与心阳片主要活性成分的 771 个作用靶点取交集, 共得到 21 个交集靶点, 即心阳片治疗 CHF 的关键靶点。心阳片改善 CHF 的核心靶点包括 CCNB1、CCNA2、CDK1、PLK1、TNF、ALOX5、CCND1; KEGG 信号通路主要富集在细胞周期、细胞衰老、FoxO、AMPK、p53、肥厚型心肌病、糖尿病并发症中的 AGE-RAGE 等。**结论** 心阳片可明显改善 CHF 小鼠的心功能, 减轻小鼠心脏的纤维化面积以及肥厚程度, 与其多成分、多靶点、多信号通路发挥的协同作用机制相关。

关键词: 心阳片; 慢性心力衰竭; 心功能; 心脏纤维化; 网络药理学; 转录组学; 小鼠

中图分类号: R285.5; R857.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2021)12-1807-10

doi: 10.19378/j.issn.1003-9783.2021.12.010

Study on the Mechanism of *Xinyang* Tablet on Prevention and Treatment of Chronic Heart Failure Based on Transcriptome and Network Pharmacology

WU Hanqin^{1,2}, CHENG Ruxi^{1,2}, ZHANG Lu^{1,2}, HE Jiaqi^{1,2}, CHEN Xin^{1,2}, WANG Lingjun^{1,2,3} (1. Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006 Guangdong, China; 2. The First Clinical College, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405 Guangdong, China; 3. Lingnan Medical Research Center, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405 Guangdong, China)

Abstract: Objective To explore the pivotal mechanisms of *Xinyang* tablet on the prevention and treatment of chronic heart failure (CHF) based on transcriptome and network pharmacology. **Methods** The CHF models were

收稿日期: 2021-03-10

作者简介: 吴晗琴, 女, 硕士, 研究方向: 中医药防治心血管疾病。Email: 1208523473@qq.com。通信作者: 王陵军, 男, 研究员, 研究方向: 中医药防治心血管疾病。Email: smu868@163.com。

基金项目: 国家自然科学基金项目(81973776)。

induced by transverse aortic constriction (TAC) surgery, thirty-two mice were randomly divided into Sham operation group, model group, *Xinyang* tablet group ($910 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) and positive control group (Perindopril $0.607 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$). After the model was successfully established, the above-mentioned doses of drugs were given by gavage ($10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$) once a day for 8 consecutive weeks. After eight weeks, we collected left ventricular ejection fraction (LVEF) and left ventricular short axis shortening rate (LVFS) and other cardiac function data by echocardiographic testing. The pathological changes of heart tissue were evaluated by Masson staining. The mRNA was extracted from heart tissues and subjected to RNA-Seq for differentially expressed genes comparison, GO analysis and KEGG pathway enrichment analysis. Active components of *Xinyang* tablet were searched from TCMS and literatures, the targets were predicted by SwissTargetPrediction platform. The common targets of transcriptomics and network pharmacology (pivotal targets of *Xinyang* tablet in the treatment of CHF) were performed by Venny website. The common targets were used to construct protein-protein interaction (PPI) network through the STRING platform. The Drugs-ingredients-common targets network was constructed by Cytoscape 3.8.0 to screen core targets, the KEGG pathway enrichment analysis of the core targets was performed, and then, we tested the expression of core targets by Real-time fluorescence quantitative PCR. **Results** As compared with the Sham operation group, the LVEF, LVFS in model group were significantly decreased ($P < 0.01$), the heart volume was increased and the cardiac coefficient was higher significantly ($P < 0.01$), and the cardiac collagen volume fraction was significantly higher ($P < 0.05$). As compared with the model group, the LVEF, LVFS in *Xinyang* tablet group were significantly increased ($P < 0.01$), the heart volume was decreased and the cardiac coefficient was lower significantly ($P < 0.01$); the cardiac collagen volume fraction was significantly lower ($P < 0.05$), and the change of positive control group was not statistically significant ($P > 0.05$). We screened out 83 active ingredients in *Xinyang* tablet. There were 354 differential genes in intersection part of the Sham operation-model group and model-*Xinyang* tablet group; furthermore, the 354 differential genes were analyzed with 771 targets of the main active ingredients of *Xinyang* tablet, which then resulted in 21 common targets (the key targets of *Xinyang* tablet in the treatment of CHF). The core targets of *Xinyang* tablet in the treatment of CHF are CCNB1, CCNA2, CDK1, PLK1, TNF, ALOX5, CCND1. The main pivotal mechanisms obtained by KEGG pathway enrichment involved the pathways of cell cycle, cellular senescence, FoxO signaling, AMPK signaling, p53, Hypertrophic cardiomyopathy (HCM), and AGE-RAGE signaling pathways in diabetic complications. **Conclusion** *Xinyang* tablet can improve cardiac function, relieve the cardiac fibrosis and hypertrophy, which is related with the synergistic mechanism of multi-component, multi-target, and multi-signal pathway.

Keywords: *Xinyang* tablet; chronic heart failure; cardiac function; cardiac fibrosis; network pharmacology; transcriptomics; mice

心血管疾病已成为我国死亡人口的首要病因, 作为心血管疾病的终末状态, 慢性心力衰竭 (Chronic heart failure, CHF) 患者逐年增多^[1]。研究^[2]表明, 神经体液、炎性反应、心室重构、氧化应激、血管内皮功能与心肌能量代谢等均与 CHF 的发生及进展过程密切相关。“益气温阳, 活血利水”是中医治疗 CHF 的主要治法之一, 本院制剂心阳片为其代表方, 能有效改善 CHF 患者的心脏病理重塑及心功能, 显著提高患者的生活质量^[3]。本课题组前期研究^[4-6]表明, 心阳片可能通过抑制心肌细胞线粒体通透性转变, 抑制心肌细胞过度自噬, 以及通过抑制

MLK3/JNK/p53 介导的心肌细胞铁死亡来发挥对心功能的改善作用。本研究拟通过结合转录组学与网络药理学方法, 从基因与分子层面探讨心阳片治疗 CHF 的潜在作用机制, 以期后续研究提供更加充分的理论基础。

1 材料与方法

1.1 动物 8 周龄雄性 C57 小鼠 32 只, SPF 级, 体质量 (24 ± 2) g, 由广州中医药大学实验动物中心提供, 动物生产许可证号: SCXK (粤) 2018-0034, 动物质量合格证号: 44007200071687。

1.2 药物及试剂 心阳片(由红参、黄芪、淫羊藿、益母草、毛冬青、葶苈子、车前子等组成,医院制剂),由广州中医药大学第一附属医院中药房提供,批准文号:粤制字 Z20071257,批号:20191101;培哌普利,天津施维雅制药有限公司,批号:H20034053。Masson 染液套装,武汉赛维尔生物科技有限公司,批号:G1006;Fastking cDNA 第一链合成试剂盒,北京天根生化科技有限公司,批号:KR116-02;SYBR Select Master Mix,美国 Thermo Fisher 科技公司,批号:4472908。

1.3 主要仪器 Minivent845 型小动物呼吸机,美国 Harvard 公司; NanoDrop 2000 型分光光度计,美国 Thermo Fisher 科技公司; Microfuge 20R 型低温高速离心机,美国 Beckman 公司; CFX96 Touch 型荧光定量 PCR 仪,美国 Bio-Rad 公司; Vevo2100 型超高分辨率小动物超声影像系统,加拿大 Visual Sonics 公司。

1.4 数据库平台及软件 ①化学成分及靶点相关数据库及软件:中药系统药理学数据库与分析平台(TCMSP, <https://tcmssp.com/index.php>)、SwissTargetPrediction (<http://www.swisstargetprediction.ch/>)、PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)、PubMed (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>)、GeneCards (<https://www.genecards.org>)及 ChemDraw 18.0 软件;②蛋白质数据库:Uniprot (<https://www.uniprot.org/>);③蛋白质互作(PPI)分析平台:STRING 11.0 (<https://string-db.org/>);④GO 功能注释及 KEGG 通路富集分析平台、软件:DAVID 6.8 (<https://david.ncifcrf.gov/>)、ClusterProfiler R 软件;⑤网络分析、可视化:Venny 2.1.0 (<http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/>);Cytoscape 3.8.0 软件。

1.5 分组、模型复制及给药 小鼠适应性饲养 1 周后,随机分为 4 组:假手术组、模型组、心阳片组($910 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)及培哌普利组($0.607 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$),每组 8 只。参照前期研究^[4],采用主动脉弓缩窄术(TAC)建立压力负荷性心力衰竭小鼠模型;选择直径 0.45 mm 的钝性针头置于主动脉弓上方并结扎,确认缝线结扎牢固后轻抽出针;假手术组进行开胸操作,暴露主动脉弓并穿线,但不进行主动脉弓结扎。造模成功后,依据人与小鼠的等效剂量换算,给药组按照上述剂量灌胃给药($10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$),假手术组、模型组给予等量生理盐水灌胃,每日 1 次,连续给药 8 周。

1.6 心脏彩超检测小鼠心功能 将小鼠经异氟烷气体吸入性麻醉、固定后,使用脱毛膏行胸部备皮;待小鼠恢复至清醒状态,采用小动物超声仪分别采集小鼠左室射血分数(LVEF)及左室短轴缩短率(LVFS)等心功能指标。

1.7 Masson 染色法观察心脏组织病理形态变化 给药 8 周后,称量小鼠体质量,采用脱臼法处死小鼠后开胸;使用 4 ℃生理盐水灌注后,剪下小鼠心脏,称量心脏质量,计算:小鼠心脏系数($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)=心脏质量(mg)/体质量(g)。将小鼠心脏组织用 4%多聚甲醛固定后,制备石蜡切片,然后进行 Masson 染色,利用 Image-Pro plus 6.0 软件对小鼠心肌组织纤维化面积进行分析,计算心脏胶原容积分数。

1.8 转录组测序分析差异基因 在验证造模成功及心阳片的治疗作用后,随机选取假手术组、模型组、心阳片组小鼠各 3 只;取出心脏并在液氮中保存 1 h 后,转移至-80 ℃冰箱冻存,由北京诺禾致源公司进行小鼠心脏组织的 RNA 提取、建库以及转录组测序。采用 DESeq2 1.16.1 软件进行组间差异表达基因分析,采用 Benjamini & Hochberg 法调整所得 P 值以控制错误发现率,以校正后的 $P < 0.05$ 为条件筛选差异基因。通过 R 软件的 ClusterProfiler 包实现差异基因的 GO 功能及 KEGG 通路富集分析。

1.9 心阳片活性成分及其作用靶点获取 使用 TCMSP 平台^[7]检索心阳片的有效成分,纳入标准:口服生物利用度(OB) $\geq 30\%$ 、类药性(DL) ≥ 0.18 ,并结合文献整理补充有效成分。使用 PubChem 网站检索各成分化学结构的 SDF 格式文件,无法获得检索结果的成分使用 ChemDraw 18.0 软件将其 mol 格式文件转换成 SDF 格式;通过 SwissTargetPrediction 网站导入各活性成分的 SDF 格式文件,预测其潜在作用靶点^[8]。

1.10 网络药理学分析 通过 Venny 平台获取转录组测序得到的假手术组-模型组差异基因与模型组-心阳片组差异基因的交集部分;通过 UniProt 数据库将交集差异基因标准化,转换为人类基因名。通过 Venny 平台对转录组测序得到的交集差异基因与“1.9”项下的活性成分作用靶点取交集,获得交集靶点,即为心阳片治疗 CHF 的关键靶点。通过 STRING 平台构建交集靶点的蛋白互作(PPI)网络。将交集靶点与相应的中药、活性成分等相关信息导入 Cytoscape 3.8.0 软件,构建“中药-活性成分-关键靶点”网络;利用网络的度值中位数筛选出心阳片防治 CHF 的核心靶点,并对核心靶点进行 KEGG 通

路富集分析。

1.11 qPCR 法检测核心靶点 mRNA 表达 采用 qPCR 法对“1.10”项下的核心靶点的 mRNA 表达情况进行验证。采用 RNA TRIzol 提取各组小鼠心脏总 RNA 后,用 cDNA 第一链合成试剂盒将总 RNA 逆转录成 cDNA;在 Bio-Rad 荧光定量 PCR 仪中进行扩增。以 GAPDH 为内参,利用 Bio-Rad CFX Manager 软件对目的基因进行数据分析。引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,引物序列见表 1。

表 1 qPCR 引物序列

Table 1 Primer sequences for qPCR

基因	上游引物序列(5'→3')	下游引物序列(5'→3')
GAPDH	AGGTCGGTGTGAACGGATTTG	TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA
CCNA2	GCCTTCACCATTTCATGTGGAT	TTGCTCCGGTAAAGAGACAG
CCNB1	AAGGTGCCTGTGTGTGAACC	GTCAGCCCCATCATCTGCCG
CCND1	GCGTACCCTGACACCAATCTC	CTCCTCTTCGCACTTCTGCTC
CDK1	AGAAGGTACTTACGGTGTGGT	GAGAGATTTCCCGAATTGCACT
PLK1	CTTCGCCAAATGCTTCGAGAT	TAGGCTGCGGTGAATTGAGAT
CHRM2	TGGTTTGGCTATTACCAGTCTC	CTGAAGGTGGCGGTTGACTT
ALOX5	ACTACATCTACCTCAGCCTCATT	GGTGACATCGTAGGAGTCCAC
PRKAA2	CAGGCCATAAAGTGGCAGTTA	AAAAGTCTGTCGGAGTCTGA
TNF	CTGAACCTTCGGGCTGATCGG	GGCTTGCTCACTCGAATTTTGAGA

1.12 统计学处理方法 采用 SPSS 25.0 软件进行数据统计分析,计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示;多组间比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA),数据呈正态分布且方差齐则组间比较采用 LSD 检验,方差不齐则采用 Dunnett's T3 检验;以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

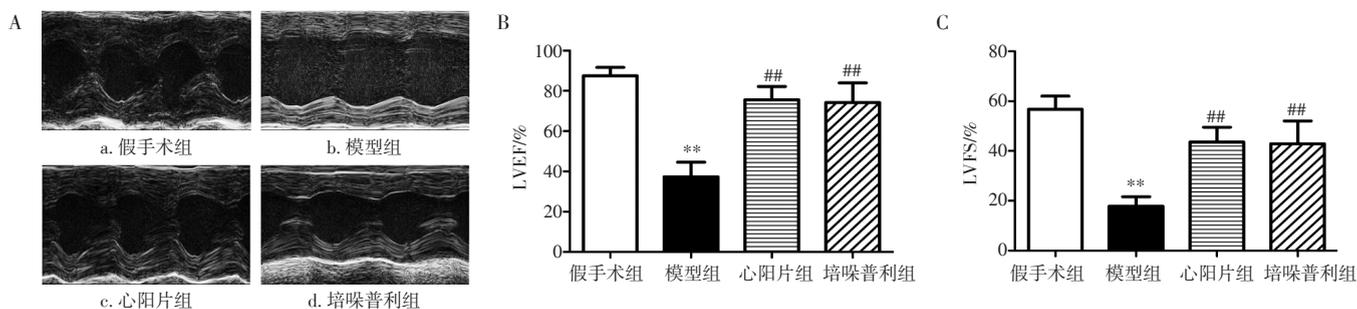
2 结果

2.1 心阳片对 CHF 小鼠心脏功能的影响 结果见图 1。与假手术组比较,模型组小鼠的 LVEF、LVFS 均显

著降低($P < 0.01$);与模型组比较,心阳片组和培哚普利组小鼠的 LVEF、LVFS 均显著升高($P < 0.01$)。结果表明,心阳片能够明显改善 CHF 小鼠的心功能。

2.2 心阳片对 CHF 小鼠心脏组织病理变化的影响 结果见图 2。与假手术组比较,模型组小鼠的心脏体积明显增大,心脏系数显著升高($P < 0.01$),心脏胶原容积分数明显升高($P < 0.05$)。与模型组比较,给药组小鼠的心脏体积明显缩小,心脏系数显著降低($P < 0.01$);心阳片组小鼠的心脏胶原容积分数明显下降($P < 0.05$),培哚普利组的变化无明显差异($P > 0.05$)。结果表明,心阳片能够有效减轻 CHF 小鼠的心肌肥厚和心肌纤维化程度,且心阳片抗心肌纤维化作用优于培哚普利。

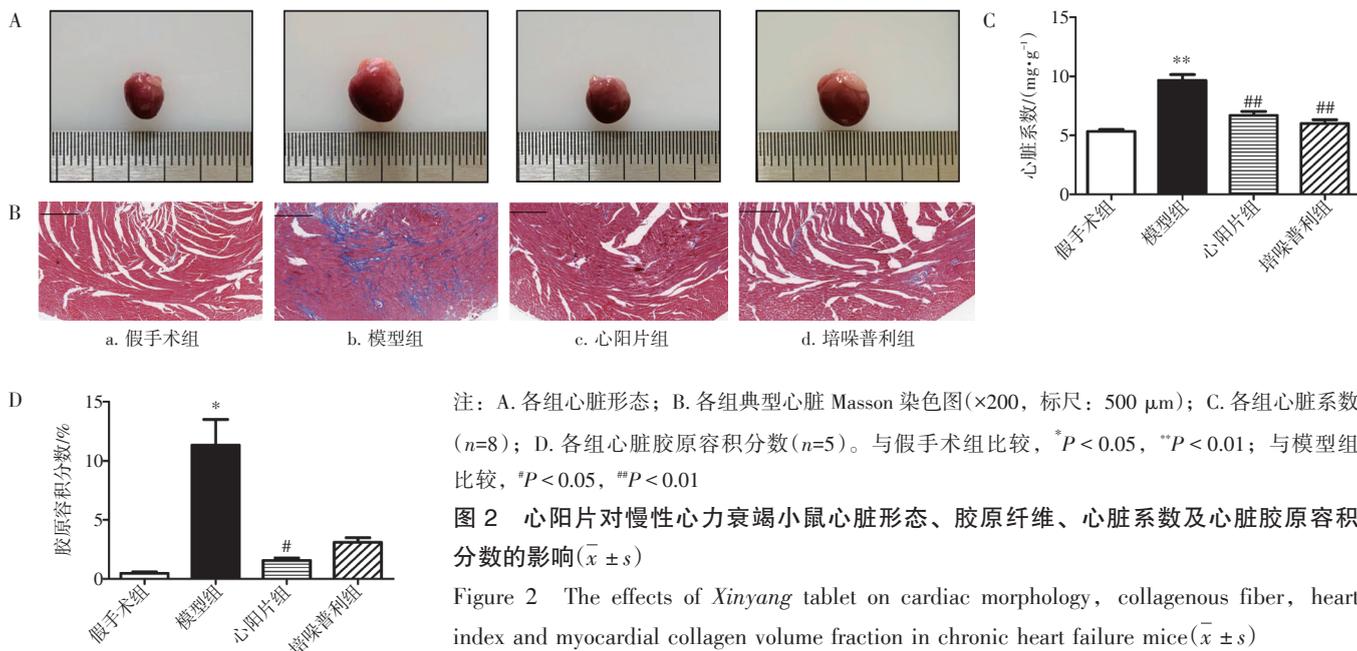
2.3 转录组差异基因的 GO 功能及 KEGG 通路富集分析 与假手术组比较,模型组存在 3 179 个差异基因,其中 1 348 个基因上调,1 831 个基因下调;差异基因主要涉及循环过程、组织发育、血管调节、细胞间质发展、胶质发生、细胞周期以及信号释放等多个与 CHF 发生相关的生物学过程;主要富集在 AMPK、核糖体、PPAR、cAMP、PI3K-Akt、胰岛素抵抗、肾素分泌、扩张型心肌病(DCM)、血管平滑肌收缩、心肌细胞的肾上腺素信号传导等 CHF 相关 KEGG 信号通路。与模型组比较,心阳片组存在 1 275 个差异基因,其中 425 个基因上调,850 个基因下调;差异基因主要集中在对脂多糖的反应、活性氧代谢过程、免疫应答调节信号通路、对机械刺激的反应、调节细胞因子的产生等多个生物学过程(见图 3-A);主要富集在 NOD 样受体、细胞因子与细胞因子受体的相互作用、cGMP-PKG、趋化因子、钙信号、TNF、细胞周期、细胞凋亡、AGE-RAGE、



注: A. 各组典型超声心动图; B. 各组左室射血分数(LVEF); C. 各组左室短轴缩短率(LVFS)。与假手术组比较, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, ## $P < 0.01$

图 1 心阳片对慢性心力衰竭小鼠超声心动图、LVEF、LVFS 的影响($\bar{x} \pm s, n=8$)

Figure 1 The effects of Xinyang tablet on echocardiogram, LVEF and LVFS in chronic heart failure mice($\bar{x} \pm s, n=8$)



注: A. 各组心脏形态; B. 各组典型心脏 Masson 染色图($\times 200$, 标尺: $500\ \mu\text{m}$); C. 各组心脏系数 ($n=8$); D. 各组心脏胶原容积分数 ($n=5$)。与假手术组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

图 2 心阳片对慢性心力衰竭小鼠心脏形态、胶原纤维、心脏系数及心脏胶原容积分数的影响($\bar{x} \pm s$)

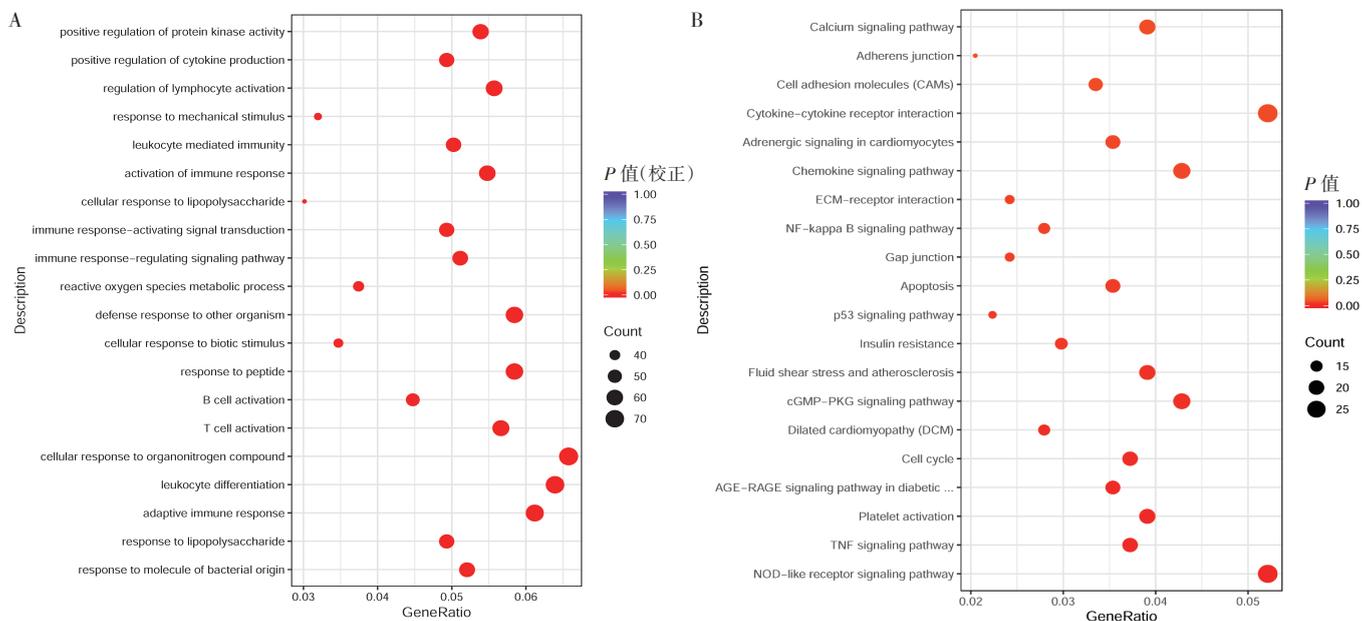
Figure 2 The effects of *Xinyang* tablet on cardiac morphology, collagenous fiber, heart index and myocardial collagen volume fraction in chronic heart failure mice($\bar{x} \pm s$)

心肌细胞的肾上腺素信号传导、ECM-受体相互作用、p53 等 CHF 相关 KEGG 信号通路(见图 3-B)。

2.4 心阳片主要活性成分及其作用靶点 通过 TCMSP 平台检索结合文献整理补充得到心阳片有效成分共 83 个, 其中红参 9 个、淫羊藿 26 个、毛冬青 8 个、葶苈子 13 个、益母草 10 个、黄芪 22 个、车前子 9 个, 重复成分 β -谷甾醇、常春藤皂苷元出现 2 次, 异鼠李素、谷甾醇出现 3 次, 山柰酚、槲皮素出现 5 次。通过 SwissTargetPrediction 网站预测有效成分

作用靶点, 合并重复靶点后, 共计得到 771 个预测靶点。结果见表 2。

2.5 转录组交集差异基因与活性成分作用靶点 经 Venny 平台分析, 假手术组-模型组的差异基因与模型组-心阳片组差异基因的交集差异基因共有 354 个, 进一步与心阳片主要活性成分 771 个作用靶点取交集, 共得到 21 个交集靶点, 即心阳片治疗 CHF 的关键靶点。



注: A. 心阳片组-模型组差异基因的 GO 功能富集结果[生物过程(BP)前 20 条]; B. 心阳片组-模型组差异基因的 KEGG 通路富集结果(前 20 条)

图 3 心阳片组-模型组差异基因的 GO 功能及 KEGG 通路富集分析

Figure 3 GO and KEGG pathway enrichment analysis of *Xinyang* tablet group-model group differential gene

表2 心阳片的主要有效成分信息

Table 2 The main active ingredients of *Xinyang* tablet

药物	序号	成分(中文名)	口服生物利用度(OB)/%	类药性(DL)	编号
黄芪(HQ)	1	Mairin(白桦脂酸)	55.38	0.78	HQ1
	2	Jaranol(华良姜素)	50.83	0.29	HQ2
	3	Hederagenin(常春藤皂苷元)	36.91	0.75	B2
	4	(3S,8S,9S,10R,13R,14S,17R)-10,13-dimethyl-17-[(2R,5S)-5-propan-2-yl-octan-2-yl]-2,3,4,7,8,9,11,12,14,15,16,17-dodecahydro-1H-cyclopenta[a]phenanthren-3-ol	36.23	0.78	HQ3
	5	Isorhamnetin(异鼠李素)	49.60	0.31	A3
	6	3,9-di-O-methylisolin(3,9,10-三甲氧基紫檀烷)	53.74	0.48	HQ4
	7	7-O-methylisomucronulatol(7-O-甲基异麦芽糖醇)	74.69	0.30	HQ6
	8	9,10-dimethoxypterocarpan-3-O-β-D-glucoside(9,10-双氧翼脑龙-3-O-β-D-葡萄糖苷)	36.74	0.92	HQ7
	9	(6aR,11aR)-9,10-dimethoxy-6a,11a-dihydro-6H-benzofuran[3,2-c]chromen-3-ol	64.26	0.42	HQ8
	10	Isoflavanone(二氢异黄酮)	0.53	0.30	HQ11
	11	Kaempferol(山柰酚)	41.88	0.24	A5
	12	(3R)-3-(2-hydroxy-3,4-dimethoxyphenyl)chroman-7-ol[(3R)-3-(2-羟基-3,4-二甲氧基苯基)铬-7-ol]	67.67	0.26	HQ14
	13	Isomucronulatol-7,2'-di-O-glucosiole(异琥珀酰甘油-7,2'-二-O-葡萄糖苷)	49.28	0.62	HQ15
	14	Quercetin(槲皮素)	46.43	0.28	B5
	15	AstragalosideIV(黄芪甲苷)	22.50	0.15	HQ17
	16	Astragalus polysaccharide(黄芪多糖)	-	-	HQ18
红参(HS)	17	DNOP(邻苯二甲酸二辛酯)	40.59	0.40	HS1
	18	Beta-sitosterol(β-谷甾醇)	36.91	0.75	A2
	19	Ginsenoside Rg3(人参皂苷 Rg3)	12.43	0.22	HS4
	20	Ginsenoside Rb1(人参皂苷 Rb1)	6.24	0.04	HS7
	21	Ginsenoside Rd(人参皂苷 Rd)	-	-	HS8
益母草(YMC)	22	Galeopsin(鼬瓣花二萜)	61.02	0.38	YMC1
	23	ZINC04073977	38.00	0.76	YMC2
	24	Preleoheterin(前益母草乙素)	85.97	0.33	YMC3
	25	Iso-preleoheterin(异前益母草乙素)	66.29	0.33	YMC4
	26	Quercetin(槲皮素)	46.43	0.28	B5
	27	Arachidonic acid(花生四烯酸)	45.57	0.20	YMC5
	28	Isorhamnetin(异鼠李素)	49.60	0.31	A3
	29	Kaempferol(山柰酚)	41.88	0.24	A5
	30	Linoleyl acetate(乙酸亚油醇酯)	42.10	0.20	YYH2
	31	Poriferast-5-en-3beta-ol(γ-谷甾醇)	36.91	0.75	YYH3
	32	DFV(甘草素)	32.76	0.18	YYH4
	33	Chryseriol[金圣草(黄)素]	35.85	0.27	YYH5
	34	8-Isopentenyl-kaempferol	38.04	0.39	YYH6
	35	Sitosterol(谷甾醇)	36.91	0.75	B3
	36	Kaempferol(山柰酚)	41.88	0.24	A5
	37	Anhydrocaritin(脱水淫羊藿素)	45.41	0.44	YYH7
	38	C-Homoerythrinan,1,6-didehydro-3,15,16-trimethoxy-,(3.beta.)-	39.14	0.49	YYH8
	39	6-hydroxy-11,12-dimethoxy-2,2-dimethyl-1,8-dioxo-2,3,4,8-tetrahydro-1H-isochromeno[3,4-h]isoquinolin-2-ium	60.64	0.66	YYH12
	40	8-(3-methylbut-2-enyl)-2-phenyl-chromone	48.54	0.25	YYH13
41	Anhydrocaritin-3-O-alpha-L-rhamnoside	41.58	0.61	YYH14	
42	Icariin(淫羊藿苷)	41.58	0.61	YYH15	
43	Icariside A7(淫羊藿苷 A7)	31.91	0.86	YYH16	
44	Luteolin(木犀草素)	36.16	0.25	YYH17	
45	Quercetin(槲皮素)	46.43	0.28	B5	
46	Epimedin A(朝藿定 A)	5.06	0.31	YYH19	

(续表 2)

药物	序号	成分(中文名)	口服生物利用度(OB)/%	类药性(DL)	编号
	47	Epimedin B(朝藿定 B)	8.65	0.34	YYH20
	48	Epimedin C(朝藿定 C)	16.29	0.34	YYH21
	49	Icariside I(淫羊藿次苷 I)	21.88	0.85	YYH22
	50	Baohuoside I(宝藿苷 I)	-	-	YYH23
葶苈子(TLZ)	51	11,14-eicosadienoic acid(11,14-二十碳二烯酸)	39.99	0.20	TLZ1
	52	Hederagenin(常春藤皂苷元)	36.91	0.75	B2
	53	Isorhamnetin(异鼠李素)	49.60	0.31	A3
	54	Beta-sitosterol(β-谷甾醇)	36.91	0.75	A2
	55	Dihomolinolenic acid(11,14,17-二十碳三烯酸)	44.11	0.20	TLZ7
	56	Kaempferol(山柰酚)	41.88	0.24	A5
	57	Quercetin(槲皮素)	46.43	0.28	B5
车前子(CQZ)	58	(4a <i>S</i> ,6a <i>R</i> ,6a <i>S</i> ,6b <i>R</i> ,8a <i>R</i> ,10 <i>R</i> ,12a <i>R</i> ,14b <i>S</i>)-10-hydroxy-2,2,6a,6b,9,9,12a-heptamethyl-1,3,4,5,6,6a,7,8,8a,10,11,12,13,14b-tetradecahydronicene-4a-carboxylic acid	32.03	0.76	CQZ1
	59	Dinatin(高车前素)	30.97	0.27	CQZ2
	60	Sitosterol(谷甾醇)	36.91	0.75	B3
	61	Daucostero_qt	36.91	0.75	CQZ3
	62	Dihydrotricetin(二氢基五羟黄酮)	58.12	0.28	CQZ4
	63	Hypolaetin	33.24	0.28	CQZ5
	64	Orobanchoside_qt(黄药苷)	55.99	0.82	CQZ6
	65	Plantagin_qt(车前苷_qt)	54.04	0.24	CQZ7
	66	Quercetin(槲皮素)	46.43	0.28	B5
毛冬青(MDQ)	67	Sitosterol(谷甾醇)	36.91	0.75	B3
	68	Spinasterol(α-菠菜甾醇)	42.98	0.76	MDQ1
	69	Kaempferol(山柰酚)	41.88	0.24	A5
	70	Asiatic acid(积雪草酸)	16.69	0.72	MDQ2

注：表中仅列出与交集靶点存在作用关系的活性成分

2.6 心阳片治疗 CHF 关键靶点的 PPI 网络分析 通过 STRING 平台构建 21 个交集靶点的 PPI 网络，得到 1 个由 36 条边构成，平均网络节点度(Average node degree)为 3.43 的 PPI 关系网络图，结果见图 4。进一步信息分析发现，CCND1、CDK1、CCNA2、CCNB1、PLK1、AURKB、TOP2A、TNF、CXCR3、ALOX5 等靶点具有较高的度(Degree)值，可能在心阳片防治 CHF 中发挥了重要作用。

2.7 中药-活性成分-关键靶点网络分析 结果见图 5。将 21 个交集靶点与相应的中药、活性成分信息导入 Cytoscape 3.8.0 软件，构建“中药-活性成分-关键靶点”网络。该网络由 84 个节点、323 条边构成，平均度值为 5.976，度值中位数为 5。依据网络度值中位数筛选出心阳片防治 CHF 的核心靶点有 CCNA2、CCNB1、CCND1、CDK1、PLK1、PRKAA2、CHRM2、ALOX5、TNF；排在前三位的核心成分为槲皮素(Quercetin)、山柰酚(Kaempferol)、异鼠李素(Isorhamnetin)、常春藤皂苷元(Hederagenin)和熊竹

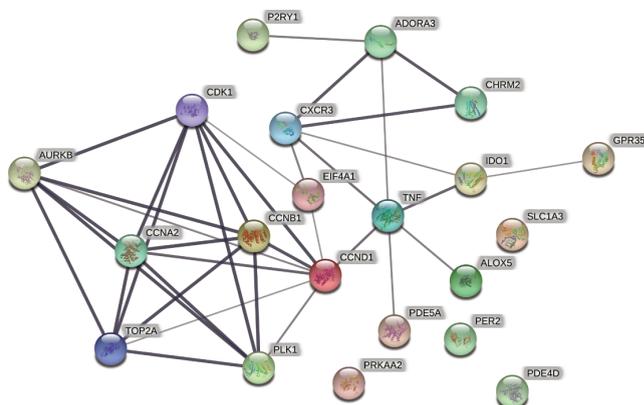
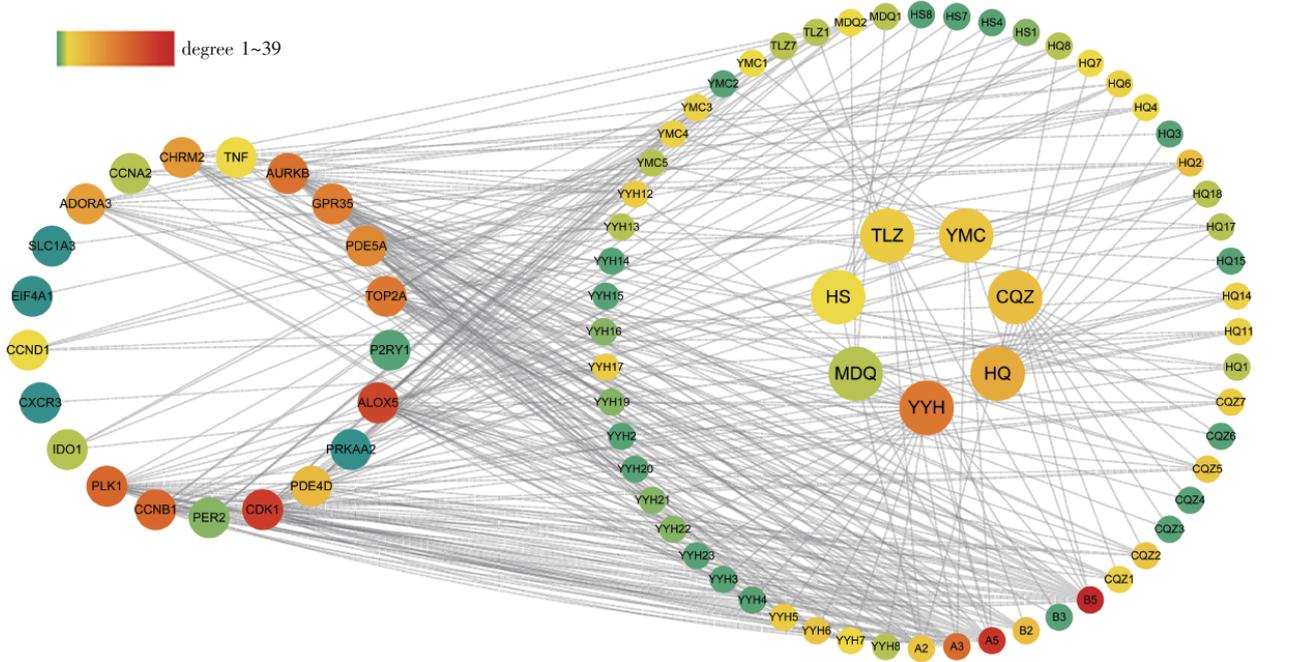


图 4 心阳片治疗慢性心力衰竭的关键靶点蛋白互作(PPI)网络
Figure 4 The PPI networks of the key targets of Xinyang tablet in the treatment of chronic heart failure

素(Jaranol)。对核心靶点进行 KEGG 信号通路富集分析，得到与 CHF 相关的信号通路主要有细胞周期、细胞衰老、FoxO、AMPK、p53、肥厚型心肌病、糖尿病并发症中的 AGE-RAGE 等。结果表明，心阳片可能通过上述通路协调发挥防治 CHF 的作用。

2.8 核心靶点的实验验证结果 qPCR 验证结果见图 6。与假手术组比较，模型组小鼠的 CCNB1、CCNA2、CDK1、PLK1、TNF、CCND1 基因表达明显上调($P < 0.05$, $P < 0.01$)，ALOX5 基因表达明显下调($P < 0.05$)。与模型组比较，心阳片组小鼠的 CCNB1、

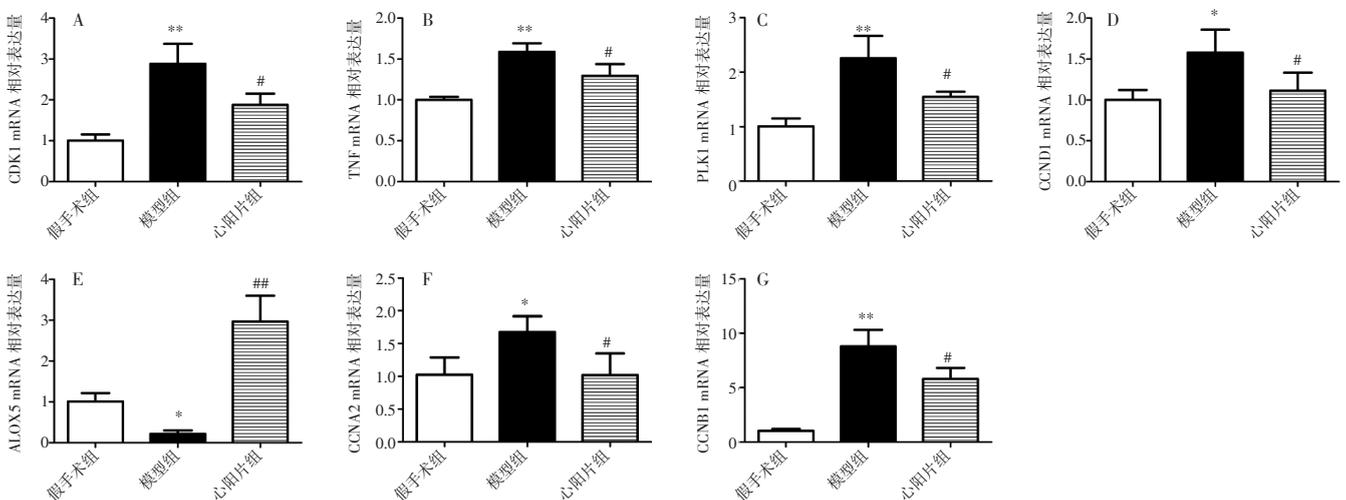
CCNA2、CDK1、PLK1、TNF、CCND1 基因表达明显下调($P < 0.05$)，ALOX5 基因表达明显上调($P < 0.01$)。各组间的 PRKAA2、CHRM2 基因表达差异无统计学意义($P > 0.05$)。结果表明，基因表达的变化基本符合转录组测序结果。



注：左侧节点圆代表关键靶点(交集靶点)；右侧节点大圆代表心阳片组成中药；右侧节点小圆代表对应活性成分。颜色深浅代表对应节点的度(degree)值大小，由绿色至红色表示度值逐渐递增

图 5 心阳片治疗慢性心力衰竭的中药-活性成分-关键靶点网络

Figure 5 “Drugs-ingredients-key targets” network of *Xinyang* tablet in the treatment of chronic heart failure



注：与假手术组比较，* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ ；与模型组比较，# $P < 0.05$ ，## $P < 0.01$

图 6 心阳片对慢性心力衰竭小鼠心脏组织中 CDK1、TNF、PLK1、CCNA2、CCNB1、ALOX5、CCND1 mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Figure 6 The effect of *Xinyang* tablet on expression of CDK1, TNF, PLK1, CCNA2, CCNB1, ALOX5, CCND1 mRNAs in heart tissue of chronic heart failure mice ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

3 讨论

中医认为慢性心力衰竭(CHF)的证候特点可以归纳为本虚为主、虚实夹杂。本虚以气虚最为常见,或伴有阴虚、阳虚之证;标实则常以痰饮、瘀血为碍,故常以益气、温阳、活血、利水为治疗大法^[9]。本院院内制剂心阳片作为益气温阳活血的代表方,其防治 CHF 的效果已在临床上得到验证^[3],但中药复方作用的复杂性,使其发挥作用的机制及成分仍不明确。口服生物利用度(OB)及类药性(DL)是药代动力学的重要指标,因此本研究以 $OB \geq 30\%$ 、 $DL \geq 0.18$ 为条件对心阳片的有效成分进行筛选^[10],结合转录组学、网络药理学以及实验验证对心阳片进行全面分析,以期从多角度、多层次探讨心阳片干预 CHF 的方-药-靶-机制。

通过网络药理学分析以及实验验证发现,心阳片防治 CHF 的核心靶点有 CCNB1、CCNA2、CCND1、CDK1、PLK1、TNF、ALOX5。抑制细胞周期蛋白依赖性激酶的表达可以介导抗心肌肥大反应^[11],部分单体和中药复方等能通过调控细胞周期蛋白和 CDK1 的表达显著抑制心脏成纤维细胞过度分化和增殖,从而防治心肌纤维化^[13-15]。细胞周期蛋白或其依赖性激酶的干预能使剩余的心肌细胞重新进入细胞周期并维持增殖信号^[16]。TNF 是一种由巨噬细胞产生的促炎因子。临床观察^[17]发现, TNF α 在心力衰竭患者中的水平升高, TNF α 的分泌增多而建立负性肌力作用造成收缩功能障碍、间质纤维化及心肌细胞凋亡,使心功能衰竭程度进一步加重。抗 TNF 治疗有利于心脏功能的恢复^[18-19]。ALOX5 是一种含铁的非血红素双加氧酶,可以通过炎症反应和脂质过氧化 2 种方式调节细胞凋亡,有研究^[18-19]证明,调控 ALOX5 的氧化磷酸化可以成为干预炎症反应及细胞凋亡的新靶点。

生物信息学分析发现,筛选得到的核心靶点主要富集于细胞周期、细胞衰老、FoxO、AMPK、p53、肥厚型心肌病、糖尿病并发症中的 AGE-RAGE 等信号通路,表明心阳片主要通过上述通路发挥防治 CHF 的作用。通过抑制心肌细胞的衰老途径,可促进心肌细胞增殖,增强对心脏功能的保护作用。细胞周期与衰老通路可以通过调控心肌肥大、心肌纤维化与心脏基质细胞的衰老参与心力衰竭过程^[13,21-22]。FoxO 通路在自噬与心脏重塑中均发挥了重要作用,可通过调节氧化应激、炎症反应在心血管疾病中发挥重要作用^[23-25]。AMPK 信号通路在氧化应

激状态下被激活,有助于提高心肌细胞肥大代偿能力,延缓心肌肥大进程,预防 CHF 的发生^[26]。p53 信号通路能够调控细胞周期、细胞自噬与凋亡,在心脏重塑过程中激活将诱导心肌细胞凋亡,从而引起 CHF^[27]。AGE-RAGE 信号通路的增强可促进心脏成纤维细胞的表型转变,引起心肌细胞外基质的积累,促进心脏纤维化的进程^[28]。

综上所述,通过转录组学及网络药理学研究发现,心阳片可能通过槲皮素、山柰酚、异鼠李素、常春藤皂苷元等活性成分,作用于 CCNB1、CCNA2、CCND1、CDK1、PLK1、TNF、ALOX5 等靶点,通过细胞周期、细胞衰老、FoxO、AMPK、p53、肥厚型心肌病、糖尿病并发症中的 AGE-RAGE 通路协调发挥防治 CHF 的作用。相关具体作用机制,有待通过进一步的实验加以验证。

参考文献:

- [1] 中国心血管健康与疾病报告编写组. 中国心血管健康与疾病报告 2019 概要[J]. 中国循环杂志, 2020, 35(9): 833-854.
- [2] 王居平, 杨维伦, 施乐. 中医药治疗慢性心力衰竭的药理机制与研究进展[J]. 实用临床医药杂志, 2020, 24(12): 125-128.
- [3] 陈冠成, 陈哲林, 方填源, 等. 心阴片和心阳片治疗慢性心力衰竭的临床观察[J]. 深圳中西医结合杂志, 2018, 28(2): 45-46.
- [4] 张璐, 何嘉琪, 梁碧容, 等. 心阳片通过抑制心肌细胞自噬改善心力衰竭小鼠心功能的作用研究[J]. 中药新药与临床药理, 2020, 31(3): 276-280.
- [5] 王俊岩, 黄育生, 刘青, 等. 心阳片抑制 MLK3/JNK/p53 介导的心肌细胞铁死亡抗慢性心力衰竭的作用及机制研究[J]. 中华中医药杂志, 2020, 35(5): 2604-2607.
- [6] 王陵军, 冼绍祥, 高梦夕, 等. 益气温阳活血法对心力衰竭大鼠心肌细胞线粒体通透性转变的影响[J]. 中药新药与临床药理, 2014(3): 276-279.
- [7] RU J, LI P, WANG J, et al. TCMSPP: a database of systems pharmacology for drug discovery from herbal medicines[J]. Journal of Cheminformatics, 2014, 6(1): 1-6.
- [8] DAINA A, MICHELIN O, ZOETE V. SwissTargetPrediction: updated data and new features for efficient prediction of protein targets of small molecules[J]. Nucleic Acids Research, 2019, 47(1): 357-364.
- [9] 陈可冀, 吴宗贵, 朱明军, 等. 慢性心力衰竭中西医结合诊疗专家共识[J]. 心脑血管病防治, 2016, 16(5): 340-347.
- [10] 许海玉, 黄璐琦, 卢鹏, 等. 基于体内 ADME 过程和网络药理学的中药现代研究思路[J]. 中国中药杂志, 2012, 37(2): 142-145.
- [11] LIU N, SU H, ZHANG Y, et al. The protective effect of 1, 25(OH)2D3 against cardiac hypertrophy is mediated by the cyclin-dependent kinase inhibitor p21[J]. European Journal of Pharmacology, 2020, 888: e173510.
- [12] FANG G, CHEN S, HUANG Q, et al. Curcumin suppresses

- cardiac fibroblasts activities by regulating the proliferation and cell cycle via the inhibition of the p38 MAPK/ERK signaling pathway[J]. *Molecular Medicine Reports*, 2018, 18(2): 1433-1438.
- [13] 姜学泽, 陈宇涵, 陈友铭, 等. 黄连素下调细胞周期蛋白依赖性激酶2活性抑制血管紧张素Ⅱ诱导的心肌纤维化[J]. *同济大学学报(医学版)*, 2020, 41(6): 691-699.
- [14] 马惠宁, 徐士欣, 吕仕超, 等. 芪参益气滴丸干预TGF- β 1刺激心脏成纤维细胞增殖的效应机制研究[J]. *中华中医药杂志*, 2017, 32(5): 1948-1951.
- [15] GONG R, JIANG Z, ZAGIDULLIN N, et al. Regulation of cardiomyocyte fate plasticity: a key strategy for cardiac regeneration [J]. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 2021, 6(1): 31-42.
- [16] CHUNG E S, PACKER M, LO K H, et al. Randomized, double-blind, placebo-controlled, pilot trial of infliximab, a chimeric monoclonal antibody to tumor necrosis factor- α , in patients with moderate-to-severe heart failure[J]. *Circulation*, 2003, 107(25): 3133-3140.
- [17] GOUWEELEEUW L, WAJANT H, MAIER O, et al. Effects of selective TNFR1 inhibition or TNFR2 stimulation, compared to non-selective TNF inhibition, on(neuro)inflammation and behavior after myocardial infarction in male mice[J]. *Brain, Behavior, and Immunity*, 2021, 93: 156-171.
- [18] BANIAAMAM M, HANDOKO M L, AGCA R, et al. The effect of anti-TNF therapy on cardiac function in rheumatoid arthritis: an observational study[J]. *Journal of Clinical Medicine*, 2020, 9(10): e3145.
- [19] SUN Q, ZHOU H, MAO X. Emerging roles of 5-Lipoxygenase phosphorylation in inflammation and cell death[J]. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2019, 2019(3): e2749173.
- [20] LAI L, SHIN G Y, QIU H. The role of cell cycle regulators in cell survival-dual functions of cyclin-dependent kinase 20 and p21Cip1/Waf1[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21(22): e8504.
- [21] MADONNA R, DORIA V, MINNUCCI I, et al. Empagliflozin reduces the senescence of cardiac stromal cells and improves cardiac function in a murine model of diabetes[J]. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 2020, 24(21): 12331-12340.
- [22] FERDOUS A, BATTIPROLU P K, NI Y G, et al. FoxO, autophagy, and cardiac remodeling[J]. *Journal of Cardiovascular Translational Research*, 2010, 3(4): 355-364.
- [23] VIVAR R, HUMERES C, ANFOSSI R, et al. Role of FoxO3a as a negative regulator of the cardiac myofibroblast conversion induced by TGF- β 1[J]. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*, 2020, 1867(7): e118695.
- [24] ZHU M, GOETSCH S C, WANG Z, et al. FoxO4 promotes early inflammatory response upon myocardial infarction *via* endothelial arg1[J]. *Circulation Research*, 2015, 117(11): 967-977.
- [25] MARINO A, HAUSENLOY D J, ANDREADOU I, et al. AMP-activated protein kinase: a remarkable contributor to preserve a healthy heart against ros injury[J]. *Free Radical Biology & Medicine*, 2021, 166: 238-254.
- [26] 常宏, 田立茹, 李佳凝, 等. P53信号通路在心衰衰竭中的作用机制[J]. *华北理工大学学报(医学版)*, 2019, 21(1): 76-80.
- [27] BURR S D, STEWART J A. Extracellular matrix components isolated from diabetic mice alter cardiac fibroblast function through the AGE/RAGE signaling cascade[J]. *Life Sciences*, 2020, 250: e117569.

(编辑: 邹元平)