

## 基于网络药理学和分子对接探讨连梅颗粒治疗心血管疾病的作⽤机制

蒋敏<sup>1</sup>, 蔡茹航<sup>1</sup>, 梅漫雪<sup>1</sup>, 龙颖欣<sup>2,3,4</sup>, 黄春霞<sup>2,3,4</sup>, 吴钉红<sup>2,3</sup>, 宋健平<sup>1</sup>(1. 广州中医药大学青蒿研究中心, 广东 广州 510403; 2. 广东省中医院, 广东 广州 510120; 3. 广东省中医院中药物质基础研究团队, 广东 广州 510120; 4. 广州中医药大学第二临床医学院, 广东 广州 510405)

**摘要:** **目的** 通过网络药理学和分子对接技术探讨连梅颗粒治疗心血管疾病(CVD)的作⽤机制。**方法** 基于TCMSP、SymMap、ETCM、TCM@taiwan 等开源数据库获取连梅颗粒的活性成分, 并通过 DrugBank、TargetNet、PubChem 等数据库预测成分靶点。通过人类基因数据库(GeneCards)、治疗靶点数据库(TTD)和基因疾病关联数据库(DisGeNET)等收集心血管疾病的作⽤靶点。通过比较毒性遗传学数据库(CTD)收集核心靶点相关的心血管疾病。利用 Cytoscape 3.8.0 软件构建中药-成分、中药-成分-核心靶点-疾病网络, 对网络进行拓扑结构分析, 筛选出关键化合物和关键靶点。提取核心子网络, 利用 DAVID 6.8 在线工具对核心子网络的靶点做基因本体(Gene Ontology, GO)分析和京都基因与基因组百科全书(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG)富集分析。利用分子对接⽅法分析关键化合物和关键靶点的相互作用关系。**结果** 成分-靶点网络分析连梅颗粒得到 9 种重要的活性化合物, 关键化合物为香草酸、槲皮素。药物、疾病网络的共同靶点 MIF、TLR9 是关键靶点, 靶点-疾病网络显示连梅具有潜在治疗作⽤的主要疾病是⾼⾎压、⼼⼒衰竭和⼼肌梗塞。GO 分析显示核心子网络与抗氧化、抗炎、调节免疫等多个生物学过程相关。KEGG 富集分析连梅颗粒得到能量代谢相关通路, 包括 cAMP 信号通路、钙信号通路和 PPAR 信号通路。分子对接显示, 香草酸、槲皮素与 MIF、TLR9 可通过氢键结合形成相互作用。**结论** 连梅颗粒及其关键成分香草酸、槲皮素可能通过以 MIF、TLR9 作为靶标发挥在⾼⾎压、⼼⼒衰竭和⼼肌梗塞疾病中的药效作⽤, 其作⽤机制涉及能量代谢通路 cAMP 信号通路、钙信号通路和 PPAR 信号通路, 以上结论有待进一步实验验证。

**关键词:** 连梅颗粒; 心血管疾病; 网络药理学; 分子对接; 香草酸; 槲皮素; MIF; TLR9

**中图分类号:** R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2022)01-0080-11

**doi:** 10.19378/j. issn. 1003-9783. 2022.01.012

### Uncovering the Mechanisms of *Lianmei* Granules on the Treatment of Cardiovascular Diseases Based on Network Pharmacology and Molecular Docking

JIANG Min<sup>1</sup>, CAI Ruhang<sup>1</sup>, MEI Manxue<sup>1</sup>, LONG Yingxin<sup>2,3,4</sup>, HUANG Chunxia<sup>2,3,4</sup>, WU Dinghong<sup>2,3</sup>, SONG Jianping<sup>1</sup> (1. Artemisinin Research Center, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510403 Guangdong, China; 2. Guangdong Provincial Hospital of Chinese Medicine, Guangzhou 510120 Guangdong, China; 3. Basic Research Laboratory of Traditional Chinese Medicine Quality, Guangdong Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510120 Guangdong, China; 4. The Second Clinical College of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405 Guangdong, China)

**Abstract: Objective** This study was designed to explore the mechanism of *Lianmei* granules on the treatment of cardiovascular diseases (CVD) through network pharmacology and molecular docking. **Methods** The chemical compositions of *Lianmei* granules(LMG) were obtained from TCMSP, SymMap, ETCM and TCM@taiwan databases. Then the targets of the ingredients were predicted through DrugBank, TargetNet, and PubChem databases. Subsequently, the targets of cardiovascular disease were collected *via* the Human Gene Database (GeneCards),

收稿日期: 2021-10-13

作者简介: 蒋敏, 女, 硕士研究生, 研究方向: 中医临床基础。Email: 20191113288@stu.gzucm.edu.cn。通信作者: 宋健平, 男, 研究员, 博士研究生导师, 研究方向: 青蒿素防治重大疾病的研究。Email: songjp@gzucm.edu.cn。

项目基金: 广东省科技计划项目(2019B020201012); 广东省中医药局科研项目(20201084)。

Therapeutic Target Database (TTD) and the Gene Disease Association Database (DisGeNET). Finally, core targets of LMG were screened and then core target-related cardiovascular diseases were collected through the Comparative Toxicogenomics Database (CTD). Cytoscape 3.8.0 software was used to construct a network of herbs-components, herbs-components-core targets-diseases respectively, key compounds of LMG and its related key targets were screened after the topological structure analysis of the network. DAVID 6.8 online tool was applied to conduct Gene Ontology (GO) analysis and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) enrichment analysis on the key targets. Ultimately, interactions between key compounds and key targets were analyzed by molecular docking methods. **Results** 9 important active compounds of LMG and 10 key targets were screened, the top 2 active compounds (according to degree value) were vanillic acid and quercetin, and the top 2 key targets (according to degree value) were MIF and TLR9. The target-disease network showed that LMG had potential therapeutic effects on hypertension, heart failure and myocardial infarction. GO analysis demonstrated that the core targets of LMG were related to multiple biological processes such as anti-oxidation, anti-inflammatory, and immune regulation. KEGG enrichment analysis suggested that the mechanism of LMG on cardiovascular diseases was related to energy metabolism pathway, including cAMP signaling pathway, calcium signaling pathway and PPAR signaling pathway. Molecular docking also demonstrated that vanillic acid and quercetin could interact with MIF and TLR9 respectively through hydrogen bonding. **Conclusion** *Lianmei* granules and its key components (vanillic acid and quercetin), may play a pharmacological effect in hypertension, heart failure and myocardial infarction diseases by targeting MIF and TLR9. Its mechanism involves energy metabolism pathway, such as cAMP signaling pathway, calcium signaling pathway and PPAR signaling pathway, the above results required further verification through experimental and clinical research.

**Keywords:** *Lianmei* granules; cardiovascular diseases; network pharmacology; molecular docking; vanillic acid; quercetin; MIF; TLR9

心血管疾病 (Cardiovascular diseases, CVD) 是威胁人类健康、影响生活质量和造成社会经济损失的全球性公共卫生问题<sup>[1]</sup>, 仅在 2015 年, 心血管疾病引起的死亡率占全世界全因死亡率的 33.33%, 其终生风险超过 60%<sup>[1]</sup>。在中国, 心血管疾病也是人口死亡和过早死亡的主要原因, 占中国人口死亡率的 40%<sup>[1]</sup>。虽然药物管理起到一定的治疗和控制作用, 其预后仍然不佳且发病率居高不下, 亟需安全、有效的新药开发, 以减轻心血管疾病的负担, 缓解心血管疾病对医学提出的严峻挑战。

连梅颗粒是国医大师伍炳彩教授结合临床经验由《温病条辨》中的连梅汤化裁而来, 包括乌梅、麦冬、生地、黄连、山药、玄参、黄芪、苍术、阿胶 9 味药。连梅颗粒对动脉粥样硬化、糖尿病心肌病等心血管疾病也具有良好的治疗效果, 可明显降低心肌组织炎症因子水平、抑制巨噬细胞泡沫化, 发挥抗动脉粥样硬化的作用等<sup>[3-4]</sup>。基于此, 为进一步研究连梅颗粒对心血管化疾病的潜在性治疗作用及其机制, 本研究结合网络药理学和分子对接的方法<sup>[5]</sup>,

阐明连梅颗粒的物质基础, 尝试从多角度探索连梅颗粒治疗心血管疾病的作用机制, 以期拓展其临床适用症和推广应用。

## 1 材料和方法

**1.1 连梅颗粒的成分收集与筛选** 连梅颗粒由黄连、黄芪、乌梅、山药、麦冬、玄参、生地、苍术、阿胶 9 味中药组成, 通过中药系统药理数据库 TCMS (https://tcmsp.com/index.php), SymMap (https://www.symmap.org/), ETCM 数据库 (http://www.tcmip.cn/) 以及台湾中医药 TCM@taiwan 数据库 (http://tcm.cmu.edu.tw/zh-tw/) 等搜集整理以上 9 味中药的主要化合物成分, 利用 PubChem 数据库 (https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/) 核对成分结构并进行化学名称的规范, 并获取候选化合物的 Canonical SMILES 号。再通过 SwissADME 平台预测候选化合物的口服生物利用度和类药性, 最后, 胃肠吸收 (gastric intestinal absorption, GI absorption) 为 “High”, 并且 5 种类药性预测 (Lipinski、Ghose、Veber、Egan、Muegge)

结果中有 2 个及 2 个以上为 “Yes”，即可最终筛选为活性化合物。由于这种筛选剔除了一些不符合条件但却有广泛药理学作用的化合物，如黄芪甲苷、哈巴昔等，为了提高预测结果的可信度，进一步通过相关文献收集了连梅颗粒的入血成分，建立连梅颗粒活性化合物数据集。

**1.2 连梅颗粒靶点预测** 基于 DrugBank、PubChem 数据库，检索连梅颗粒活性化合物的对应靶点。经 DrugBank、PubChem 未找到对应靶标的化合物，通过 TargetNet (<http://targetnet.scbdd.com/calcnnet/index/>) 平台，利用活性成分的 Canonical SMILES 号，预测成分的潜在靶点，设置 ROC 曲线下面积的参数  $AUC \geq 0.7$ ，Fingerprint type: ECFP4 fingerprint，收集 Prob=1 的靶点，同时利用 UniProt (<http://www.uniprot.org>) 数据库剔除非人源的靶点，最后形成连梅颗粒的潜在靶点群。

**1.3 心血管疾病靶点收集** 应用 TTD 数据库 (<http://db.idrblab.net/ttd/>)、DisGeNET 数据库 (<http://www.disgenet.org/>)、GeneCards (<https://www.genecards.org/>) 以 “Cardiovascular Disease” 为检索词搜集心血管疾病靶点。在疾病靶点的整合中，靶点的分值越大，说明该靶点与疾病的关系越密切。故在 DisGeNET 数据库和 GeneCards 数据库中选择分数高于平均值的靶点，删除重复冗杂的基因，合并 3 个数据库所获得的数据作为心血管疾病相关靶点。

**1.4 连梅颗粒靶向心血管疾病的核心子网络** 以高质量全基因组 HINT 数据库 (<http://hint.yulab.org/>) 获得的人类疾病基因作为背景网络，利用 Cytoscape 3.8.0 软件分别构建连梅颗粒成分预测靶点和心血管疾病靶点的 PPI 网络，通过 Merge 插件，提取连梅颗粒的 PPI 网络和心血管疾病 PPI 网络的交集，形成连梅颗粒靶向心血管疾病的核心子网络。

**1.5 连梅颗粒靶向心血管疾病病种的获取** 将最终得到的连梅颗粒靶向心血管疾病的核心子网络中的靶点，映射到 CTD 数据库 (<http://ctd-base.org/>) 获取对应的疾病信息，筛选总结出 “1.4” 项下连梅颗粒核心靶点所对应的具体心血管疾病病种。

**1.6 网络构建和分析** 利用 Cytoscape 3.8.0 软件，构建连梅颗粒中药-成分-靶点-疾病网络图，根据度值及网络拓扑结构分析，找出网络中的关键节点。根据节点连接度 (degree)、节点紧密度 (closeness) 和节点介度 (betweenness) 对核心子网络进行分析，筛选连梅颗粒的关键活性成分、关键靶点以及主要的心血管疾病病种。

**1.7 GO 分析和 KEGG 通路富集分析** 利用 DAVID 6.8 在线分析工具 (<https://david.ncifcrf.gov/>) 对提取的连梅颗粒核心子网络的靶点进行 GO 分析和 KEGG 通路富集分析；利用 OmicSharetool 在线平台 (<http://www.omicshare.com/tools>) 绘制通路富集气泡图。

**1.8 分子对接验证关键化合物与关键靶点的相互作用关系** 通过分子对接方法对分析筛选出的关键化合物和关键靶点的相互作用进行计算机预测和验证。从 PDB 数据库 (<https://www.rcsb.org/>) 和 PubChem 数据库 (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) 分别下载关键蛋白 MIF (PDB ID: 6B1K)、TLR9 (Conformer3D\_CID\_54760476) 蛋白的蛋白结构。通过软件 PyMOL，在命令框中输入 “remove solvent”，对蛋白进行去水处理，根据 PDB 有关该蛋白的说明，去除蛋白上携带的离子及小分子等。随后利用 AutoDockTools 1.5.6 软件，通过 “add hydrogen” 对蛋白进行加氢、计算电荷等处理，保存为 pdbqt 格式。从 PubChem 数据库中下载关键化合物香草酸 (PubChem CID: 8468)、槲皮素 (PubChem CID: 5280343) 的化学结构，保存为 \*mol2 格式。利用 ChemBio3D Ultra 软件，点击 “Calculations”，选择适合小分子化合物的 MM2 力场，对小分子化合物进行能量最小化处理。通过软件 Autodock Vina 1.1.2 进行分子与蛋白对接，选取结合能 (Binding energy) 数值最小的构象，通过 PyMOL 进行分析作图。

## 2 结果

**2.1 连梅颗粒的活性成分** 从 TCMSp、BATMAN-TCM、SymMap、ETCM、TCM@taiwan 5 个数据库中共搜集到了 669 个候选化合物成分，通过 SwissADME 平台根据候选化合物的口服生物利用度和类药性筛选出化学活性成分 410 个，其中黄连 55 个、黄芪 72 个、乌梅 33 个、山药 66 个、麦冬 35 个、玄参 52 个、生地黄 46 个、苍术 48 个、阿胶 3 个，去重后最终得到连梅颗粒活性成分 380 个，部分药物-成分对应信息如表 1 所示。由图 1 可见，通过网络分析，发现度 (Degree) 值排前 5 位的成分是 Palmitic acid (棕榈酸)、Vanillic acid (香草酸)、Ferulic acid (阿魏酸)、Quercetin (槲皮素)、Eugenol (丁香酚)，说明以上成分对应的潜在靶点较多，可能是连梅颗粒的主要药效成分。

**2.2 连梅颗粒成分靶点和心血管疾病靶点汇总及 PPI 网络分析** 通过 PubChem 数据库和 TargetNet 平台成功预测到连梅颗粒的作用靶点 6 608 个，其中，黄连

表 1 连梅颗粒药物-成分对应表

Table 1 Drug-components correspondence table of *Lianmei* granules

单个中药对应多个成分		单个成分对应多个中药	
药物	成分	成分	药物
黄连	去甲乌药碱	棕榈酸	苍术
	对香豆酸		黄芪
	穆坪马兜铃酰胺		山药
	羟基酪醇		玄参
黄芪	汉黄芩素	香草酸	乌梅
	鼠李糖		黄芪
	辣椒素		苍术
	咖啡酸		黄连
山药	山奈酚	阿魏酸	玄参
	γ-氨基丁酸		黄连
	薯蓣皂甙元		黄芪
	赖氨酸		生地
玄参	肉豆蔻醚	槲皮素	玄参
	熊果酸		黄芪
	β-谷甾醇		黄连
	天门冬酰胺		乌梅
苍术	β-桉叶醇	丁香酚	玄参
	柠檬苦素		山药
	愈创醇		乌梅

919个、黄芪1417个、乌梅784个、山药990个、麦冬325个、玄参949个、生地552个、苍术622个、阿胶50个，通过Uniprot标准化人源后并除重总共得到连梅颗粒283个靶点。心血管疾病靶点一共收集到1794个，其中TTD数据库33个，DisGeNET数据库486个、GeneCards数据库1275个。在疾病靶点的整合中，删除重复冗杂的基因，合并3个数据库获得1557个心血管疾病相关靶点。然后，基于HINT数据库人类疾病基因网络，上传连梅颗粒预测靶点与心血管疾病靶点至STRING(<https://string-db.org/>)平台，筛选最高置信度 $\geq 0.9$ 的靶点交互信息；利用Cytoscape 3.8.0软件分别构建连梅颗粒成分预测靶点和心血管疾病靶点的蛋白互作(PPI)网络；通过Merge插件，形成连梅颗粒靶向心血管疾病的核子网络，提取连梅颗粒人类心血管疾病靶点96个(图2)。重点展示度值较高的前20个连梅颗粒活性成分靶点(表2)。

**2.3 连梅颗粒靶向心血管疾病病种** 将“2.2”项下筛选的96个连梅颗粒靶点通过CTD数据库，参数设置为精准预测，预测发现连梅颗粒作用靶点与253种疾病相关，剔除与心血管无关的疾病，得到连

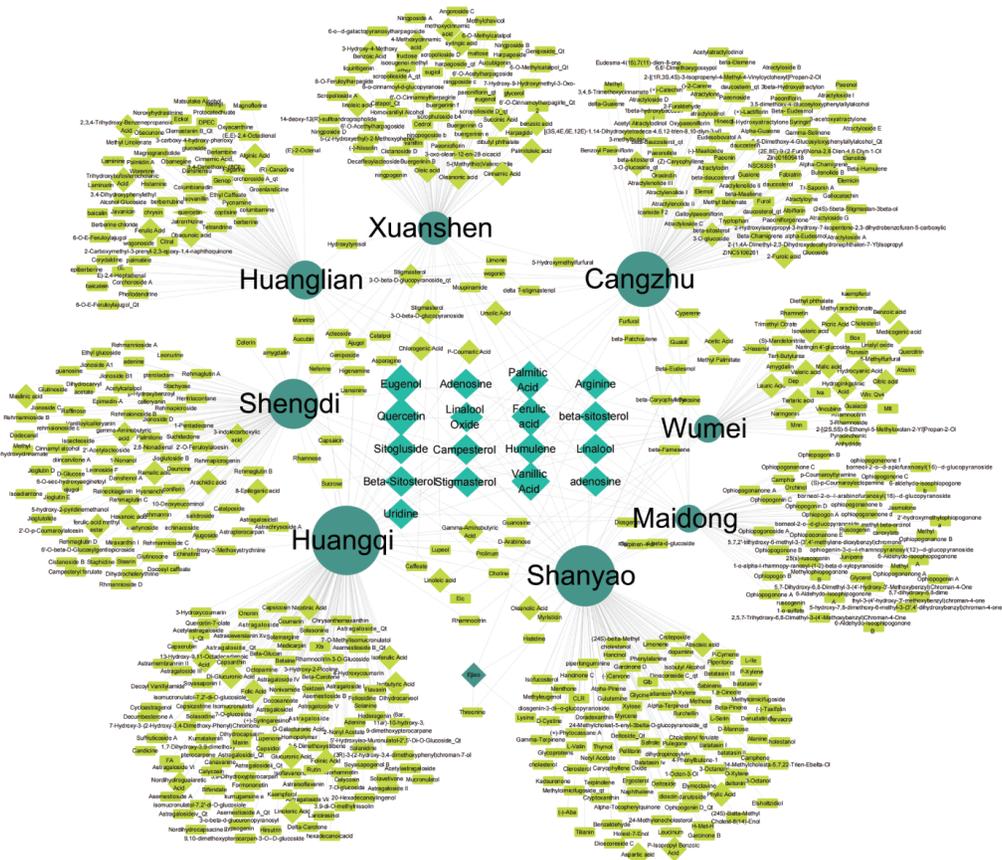


图 1 连梅颗粒中药-化学成分网络图  
Figure 1 Drug-Component network of *Lianmei* granules

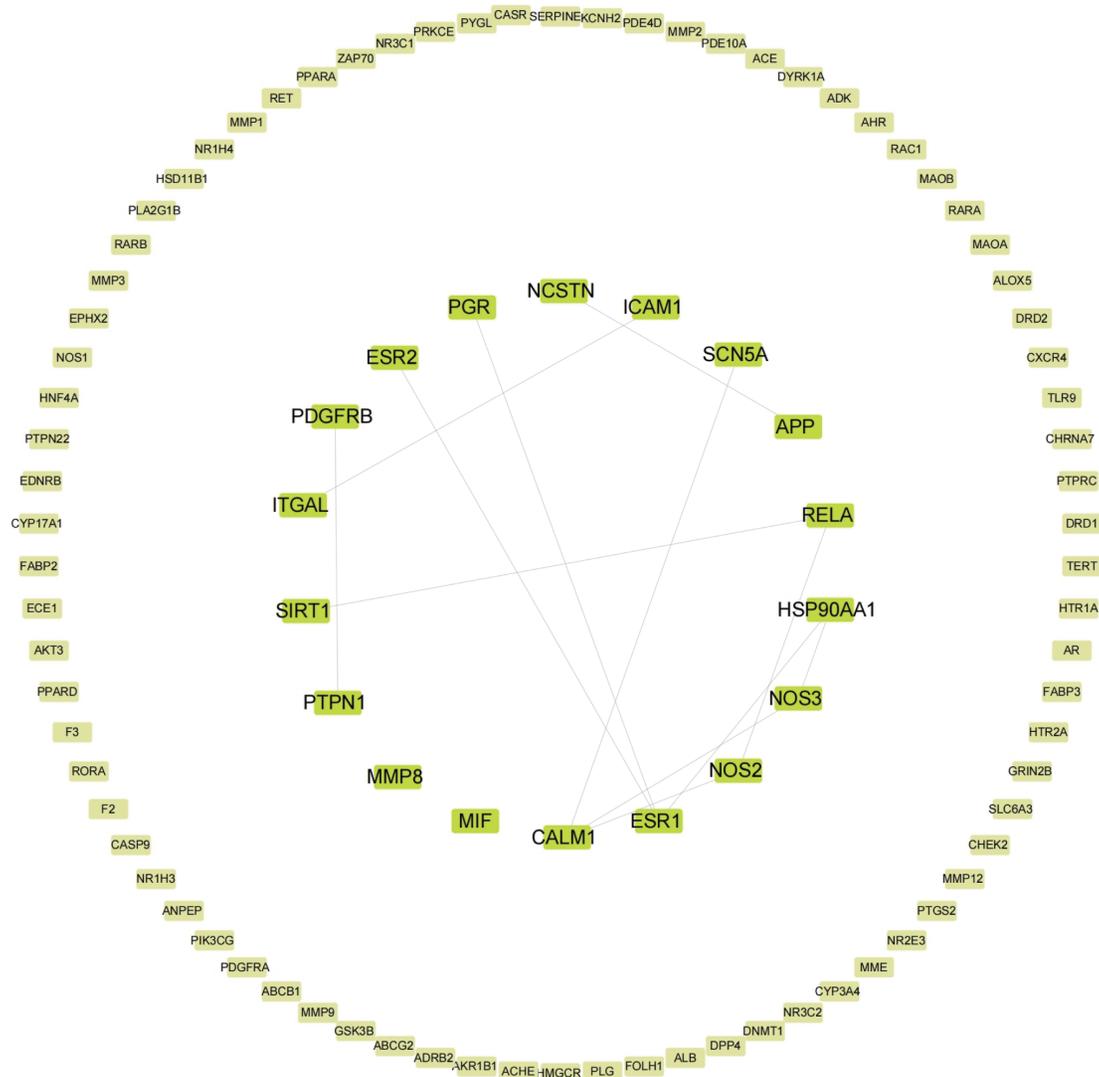


图 2 连梅颗粒靶向心血管疾病(CVD)的核心子网络靶点

Figure 2 The core targets network of *Lianmei* granules in the treatment of CVD

表 2 连梅颗粒靶向心血管疾病(CVD)的核心子网络部分靶点(度值排名前 20 位)

Table 2 The core targets of *Lianmei* granules in the treatment of CVD(ranking top 20 in degree value)

序号	名称	基因简称	UniprotID	序号	名称	基因简称	UniprotID
1	Estrogen receptor	ESR1	P03372	11	Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 1	PTPN1	P18031
2	Calmodulin-1	CALM1	P0DP23	12	NAD-dependent protein deacetylase sirtuin-1	SIRT1	Q96EB6
3	Heat shock protein HSP 90-alpha	HSP90AA1	P07900	13	Integrin alpha-L	ITGAL	P20701
4	Nitric oxide synthase, inducible	NOS2	P35228	14	Nicestrin	NCSTN	Q92542
5	Nitric oxide synthase, endothelial	NOS3	P29474	15	Sodium channel protein type 5 subunit alpha	SCN5A	Q14524
6	Transcription factor p65	RELA	Q04206	16	ATP-dependent translocase ABCB1	ABCB1	P08183
7	Platelet-derived growth factor receptor beta	PDGFRB	P09619	17	Broad substrate specificity ATP-binding cassette transporter ABCG2	ABCG2	Q9UNQ0
8	Estrogen receptor beta	ESR2	Q92731	18	Aldo-ketoreductase family 1 member B1	AKR1B1	P15121
9	Progesterone receptor	PGR	P06401	19	3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase	HMGR	P04035
10	Amyloid-beta precursor protein	APP	P05067	20	Albumin	ALB	P02768

梅颗粒具有治疗潜在性的心血管疾病 93 种, 表 3 仅展示度值、介数中心性值较高的前 20 个连梅颗粒潜在治疗疾病病种。

2.4 连梅颗粒药物-成分-靶点-疾病网络拓扑结构

分析 将连梅颗粒 9 味中药成分、380 个化学活性成分、96 个靶向人类心血管疾病靶点、93 种潜在治疗作用的心血管疾病构建连梅颗粒的药物-成分-靶点-疾病网络。如图 3 所示, 连梅颗粒的药物-成分-靶

表 3 连梅颗粒靶向心血管疾病(CVD)部分病种(前 20 位)

Table 3 Information of CVD affected by core targets of *Lianmei* granules(top 20)

序号	疾病名称	度值 (Degree)	介数中心性 (Betweenness Centrality)	序号	疾病名称	度值 (Degree)	介数中心性 (Betweenness Centrality)
1	Hypertension	19	0.241 021 241	11	Cardiomegaly	6	0.035 723 086
2	Heart Failure	14	0.129 575 974	12	Cardiomyopathies	6	0.023 408 304
3	Myocardial Infarction	10	0.098 879 871	13	Myocardial Ischemia	5	0.023 483 222
4	Myocardial Reperfusion Injury	10	0.086 318 081	14	Thrombosis	5	0.021 385 705
5	Atherosclerosis	8	0.054 790 201	15	Subarachnoid Hemorrhage	4	0.032 029 441
6	Brain Ischemia	8	0.033 602 907	16	Hypertension, Pulmonary	4	0.009 866 401
7	Coronary Artery Disease	7	0.143 757 065	17	Arrhythmias, Cardiac	4	0.008 569 932
8	Atrial Fibrillation	7	0.030 222 735	18	Cerebral Hemorrhage	4	0.004 971 503
9	Reperfusion Injury	7	0.028 614 884	19	Ventricular Dysfunction, Left	4	0.003 406 339
10	Stroke	6	0.082 194 426	20	Diabetic Angiopathies	3	0.002 969 096

点-疾病网络有 584 个节点, 4 327 条边。根据度值调节其形状大小, 度值越大, 颜色越深、形状越大; 经网络拓扑结构分析, 连接度排在前 9 位的活性成分为 Vanillic acid(香草酸)、Quercetin(槲皮素)、Ferulic acid(阿魏酸)、P-Coumaric Acid(对香豆酸)、Caffeate(咖啡酸)、Acetic acid(醋酸)、Rhamnocitrin(鼠李黄酮)、Furfural(糠醛)、Eugenol(丁香酚), 它们是连梅颗粒中的重要活性成分。香草酸和槲皮素的度值在所有重要活性成分中排名最高。连梅颗粒“药物-成分-靶点-疾病”网络显示, 度值排在前 10 位的靶点为 MIF、TLR9、MAOA、ABCG2、AHR、MAOB、RELA、ESR2、ESR1、NOS3, 靶点 MIF 和 TLR9 为网络中度值最高的靶点。网络度值排在前面的疾病为 Hypertension(高血压)、Heart failure(心力衰竭)、Myocardial Infarction(心肌梗塞)、Myocardial Reperfusion Injury(心肌再灌注损伤)、Atherosclerosis(动脉硬化)、Brain Ischemia(脑缺血)、Coronary Artery Diseases(冠状动脉疾病)、Atrial Fibrillation(房颤), 其中, 高血压、心力衰竭、心肌梗塞和心肌再灌注损伤度值排名较前。表 4 所示为度值排名前 10 位的连梅颗粒主要活性成分、对应的靶点及其潜在治疗疾病病种, 可见黄连、黄芪为主要发挥作用的中药。因此, 我们初步预测, 连梅颗粒活性成分香草酸和槲皮素可能通过 MIF、TLR9 靶蛋白起到治疗心血管疾病的作用, 其治疗心血管疾病包括高血压、心力衰竭、心肌梗塞、心肌再灌注损伤等。

**2.5 筛选活性化合物及其靶点的分子对接分析** 基于网络拓扑结构分析可知, 香草酸和槲皮素和 MIF、TLR9 蛋白分别是拓扑结构分析网络的主要成分和靶

点。如图 4~图 6 和表 5 分子对接结果所示, 香草酸通过 1 个氢键与 MIF 蛋白的残基 ASN6 形成相互作用关系, 最高对接得分为-6.5; 槲皮素通过 5 个氢键与 MIF 蛋白的残基 ASN6、SER60 形成相互作用关系, 最高对接得分为-9.7; MIF 蛋白分子阳性对照药 ISO-1 与 MIF 蛋白分子通过 4 个氢键与两个残基相互作用, 最高对接得分为-8.5。以上提示香草酸、槲皮素、MIF 蛋白分子阳性对照药 ISO-1 与 MIF 蛋白结合均较稳定。如图 7 所示, TLR9 与香草酸、槲皮素的结合能分别为-3.9、-2.8, 其阳性对照药 Chloroquine(NSC-187208)与 TLR9 蛋白分子对接结合能为-3.1, 香草酸、槲皮素、Chloroquine(NSC-187208)与 TLR9 蛋白分子结合能水平均较低, 分析其原因可能与 TLR9 蛋白为新分子, PDB 数据库尚未有全面的蛋白结构, 采用的是 pubchem 化合物数据库中 TLR9 的结构文件有关。

**2.6 连梅颗粒核心网络靶点基因本体 GO 富集分析**

对连梅颗粒 96 个核心网络靶点进行基因本体 GO 和 KEGG 通路富集分析, 选择  $P < 0.05$  的生物过程、分子功能、细胞组分 3 个模块前 15 个富集 Score 绘制条形图(图 8)。在生物学过程(Biological process, BP)中, 主要涉及 RNA 聚合酶 II 启动子转录的正调控、信号转导、DNA 转录、RNA 聚合酶 II 启动子的转录起始、蛋白水解、DNA 转录的正调控, 对药物的反应、积极调控细胞增殖、RNA 聚合酶 II 启动子转录的负调控、类固醇激素介导的信号通路、凋亡过程的负调控、氧化还原过程、炎症反应、细胞对脂多糖的反应、细胞增殖的负调控; 在细胞组成(Cellular component, CC)中, 主要涉及细胞表面、质膜、细胞外空间、细胞外泌体、细胞质的核周区



表 4 连梅颗粒靶向心血管疾病(CVD)的度值前 10 位的成分、靶点和疾病种类

Table 4 Key components, targets and diseases for the treatment of CVD with *Lianmei* granules(ranking top 10 in degree value)

药物	成分名称		靶点简称	疾病名称	
	英文名称	中文名称		英文名称	中文名称
黄连、黄芪、玄参、苍术	Vanillic acid	香草酸	MIF	Hypertension	高血压
黄连、黄芪、乌梅	Quercetin	槲皮素	TLR9	Heart failure	心力衰竭
黄连、黄芪、玄参、生地	Ferulic acid	阿魏酸	MAOA	Myocardial Infarction	心肌梗死
黄连、黄芪	P-Coumaric Acid	对香豆酸	ABCG2	Myocardial Reperfusion Injury	心肌缺血再灌注
黄连、黄芪、玄参	Caffeate	咖啡酸	AHR	Atherosclerosis	动脉硬化
黄芪、苍术	Acetic acid	醋酸	MAOB	Brain Ischemia	脑缺血
黄芪、乌梅	Rhamnocitrin	鼠李黄酮	RELA	Coronary Artery Diseases	冠状动脉疾病
苍术、乌梅	Furfural	糠醛	ESR1	Atrial Fibrillation	房颤
山药、玄参、乌梅	Eugenol	丁香酚	ESR2	subarachnoid hemorrhage	蛛网膜下腔出血
山药、阿胶	Lysine	赖氨酸	NOS3	Cardiomegaly	心脏肥大

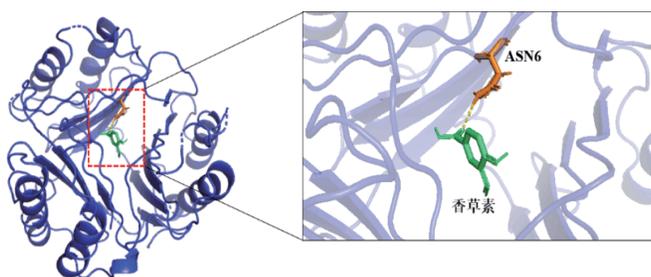


图 4 香草酸与 MIF 蛋白分子对接示意图

Figure 4 Docking diagrams of vanillic acid-MIF interaction

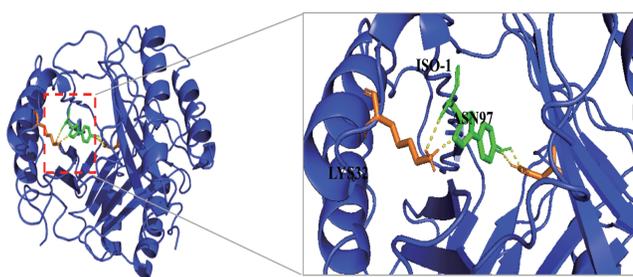


图 6 ISO-1 阳性药与 MIF 蛋白分子对接示意图

Figure 6 Docking diagrams of ISO-1-MIF interaction

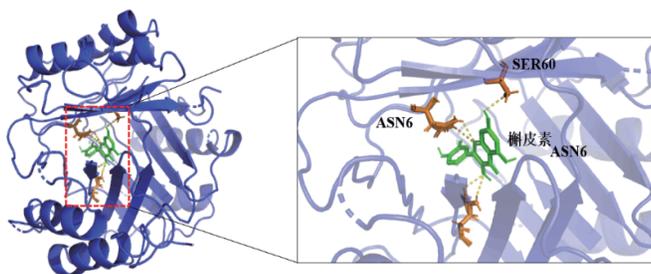


图 5 槲皮素与 MIF 蛋白分子对接示意图

Figure 5 Docking diagrams of Quercetin-MIF interaction

表 5 连梅颗粒活性成分香草酸、槲皮素及阳性药 Chloroquine(NSC-187208)和 MIF、TLR9 蛋白对接结果

Table 5 Results of Vanillic acid, Quercetin and positive control drugs docking with MIF and TLR9

蛋白全称	蛋白简称	盒子大小 (X, Y, Z)	盒子中心坐标 (X, Y, Z)	化合物	结合能/ (kcal·mol <sup>-1</sup> )
Macrophage migration inhibitory factor	MIF	40, 40, 40	-44.827, -11.776, 4.982	香草酸	-6.5
				槲皮素	-9.7
				ISO-1	-8.5
Toll-like receptor 9	TLR9	44, 28, 20	-1.704, 0, 0	香草酸	-3.9
				槲皮素	-2.8
				Chloroquine	-3.1

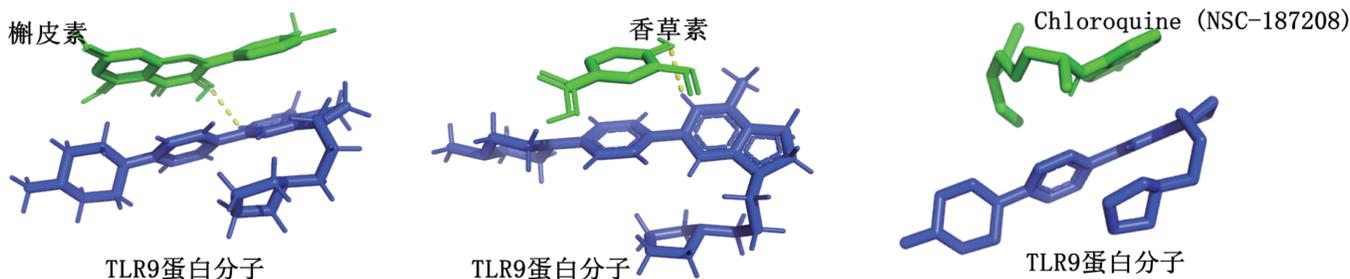


图 7 槲皮素、香草酸及阳性药 Chloroquine(NSC-187208)与 TLR9 蛋白分子对接示意图

Figure 7 Docking diagrams of vanillic acid, quercetin and chloroquine(NSC-187208) binding with TLR9

异性 DNA 结合、ATP 结合、药物结合、相同的蛋白质结合、RNA 聚合酶 II 转录因子活性、丝氨酸型内肽酶活性、蛋白激酶结合等。

**2.7 连梅颗粒核心网络靶点 KEGG 通路富集分析**  
对连梅颗粒 96 个核心网络靶点进行 KEGG 通路富集分析, 共获得 74 条通路, 以  $P < 0.05$ , 基因数  $\geq 3$  个为度, 显著富集的通路有 56 条, 与心血管相关的通

路有 20 条(图 9)。结果显示, 核心子网络的靶点涉及的主要疾病通路为心肌能量代谢通路。其中与心肌能量代谢有关的通路有 4 条, 分别为 cAMP 信号通路、钙信号通路、PPAR 信号通路、病毒性心肌炎信号通路; 与神经-免疫调节系统相关的通路有 3 条, 分别是神经活性配体-受体相互作用、B 细胞受体信号传导途径、T 细胞受体信号传导途径; 与信号

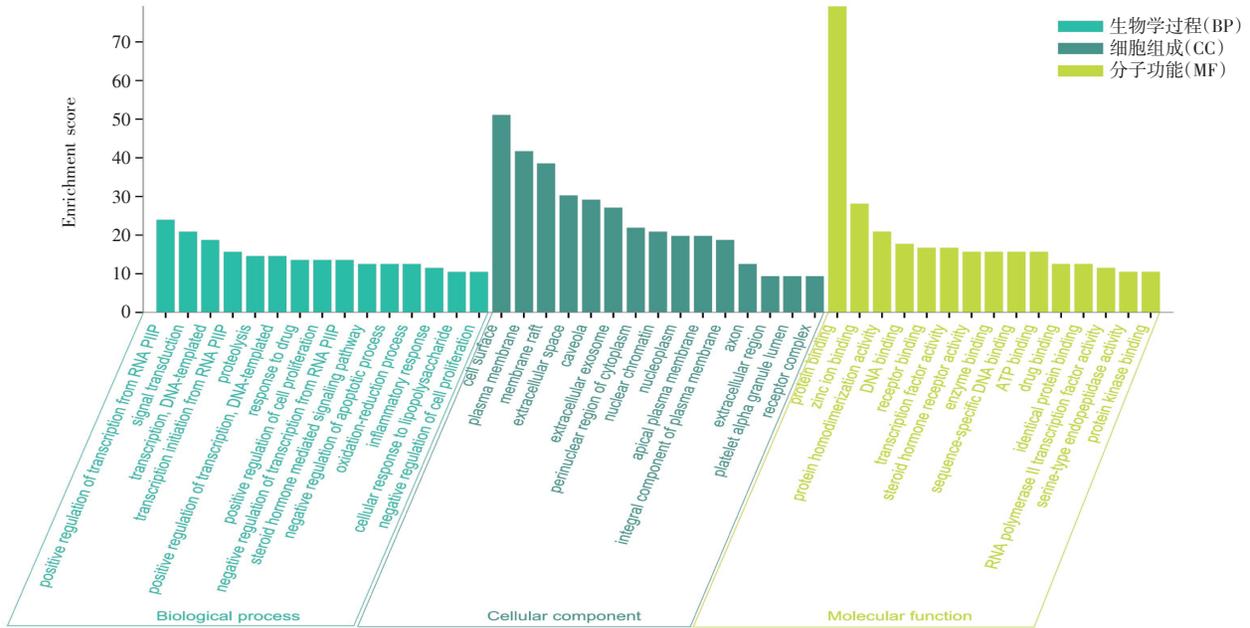


图 8 连梅颗粒靶向心血管疾病(CVD)的核心网络靶点基因本体 GO 富集分析条形图

Figure 8 GO function enrichment analysis of core targets for the treatment of CVD with *Lianmei* granules

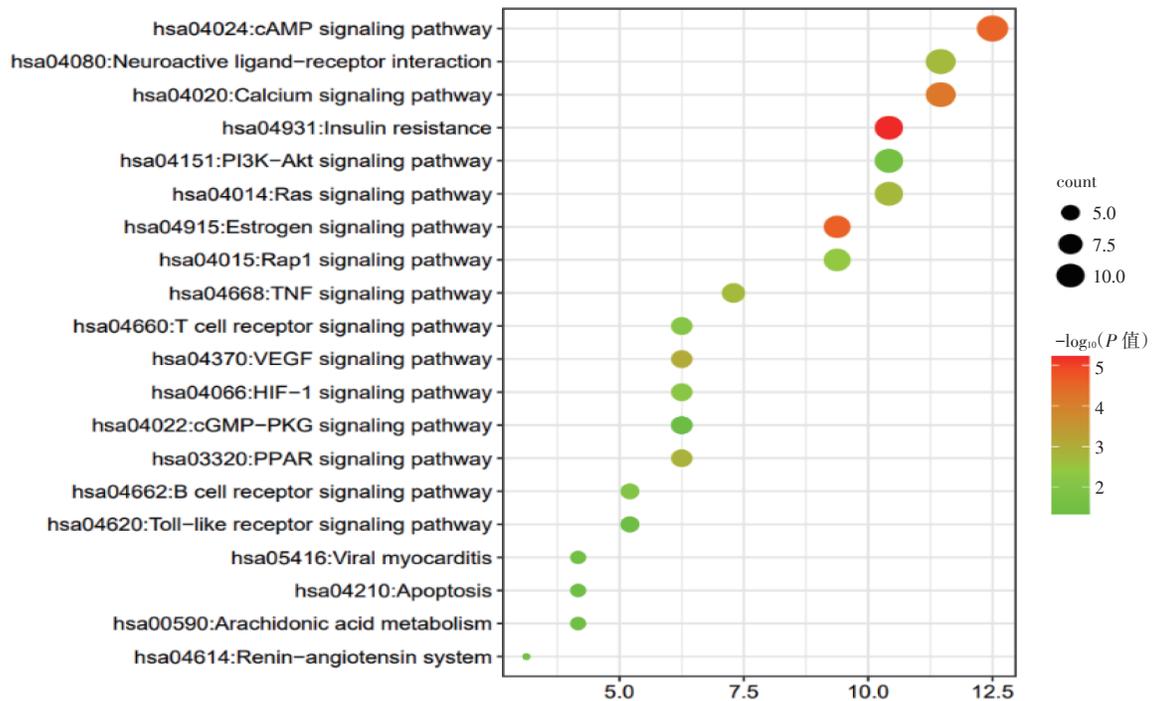


图 9 连梅颗粒靶向心血管疾病(CVD)的核心网络靶点 KEGG 通路富集气泡图

Figure 9 Bubble diagram of KEGG pathway enrichment analysis of core targets for the treatment of CVD with *Lianmei* granule

转导的通路有 3 条, 分别为 HIF-1 信号通路、PI3K/AKT 信号通路、cGMP-PKG 信号通路; 与炎症信号相关的通路有 4 条, 分别为雌激素信号通路、TNF 信号通路、花生四烯酸代谢通路、Toll 样受体信号通路; 与肾素-血管紧张素系统相关的通路有 2 条, 分别为胰岛素抵抗、肾素-血管紧张素系统途径; 与细胞增殖相关的信号通路有 3 条, 分别为 Ras 信号通路、Rap1 信号通路、VEGF 信号通路; 与细胞生长和死亡相关的通路有 1 条, 为细胞凋亡通路。

### 3 讨论

网络药理学从系统生物网络层次解析药物成分与疾病之间的相关性, 为阐释中医药整体作用机制、药物组合和配伍规律提供了新思路、方法和技术<sup>[5]</sup>。分子对接基于结构相似性辅助药物设计原理, 研究分子间(如配体和受体)的相互作用, 并预测其结合模式和亲合力。通过网络药理学和分子对接技术, 可对连梅颗粒的药物成分和作用进行解析, 为其在心血管疾病方面的整体作用机制提供现代药理学依据。

**3.1 连梅颗粒具有潜在治疗作用的心血管疾病** 研究表明, 连梅颗粒对高血压、心力衰竭、心肌梗塞疾病具有潜在治疗作用。连梅颗粒以乌梅、黄连为君药, 乌梅敛肺, 涩肠, 生津止渴, 具有涩、收特性, 黄连苦寒, 可清热、泻火和解毒, 具有寒下、清降特性, 两者共为君药; 臣药为黄芪和苍术, 具有健脾益气作用, 增强心肌收缩力, 与君药协同, 升降有序, 协调心脏的收缩力和血管的舒张度; 黄连主要成分可抑制心肌细胞自噬、凋亡, 改善心梗模型大鼠心肌氧化水平和线粒体呼吸功能障碍<sup>[6]</sup>; 乌梅主要成分、黄芪主要成分、苍术主要成分等均具有抗炎、抗氧化、降血脂和血糖、强心、抗心律失常、抗高血压、抗心肌缺血再灌注损伤等多种药理作用<sup>[7-8]</sup>; 麦冬、生地、玄参、阿胶为佐药, 滋阴、养血、活血, 维持阴液(血量)的充足, 滋润心脏和心血管, 脏腑功能得以维持; 山药为使药, 益气养阴, 补脾肺肾气, 既可促使全身血液归心, 也可鼓动血液流动至全身。本研究在“君-臣-佐-使”的基础上, 通过网络拓扑结构分析发现, 在前面 10 种重要的活性成分中, 主要来自于黄连、黄芪、玄参、苍术、生地、山药、乌梅, 其中 5 种来源于黄连, 7 种来源于黄芪, 4 种来自于玄参和乌梅, 其靶点集占连梅颗粒核心靶点集 83.33%(80/96)的靶点, 由此可推测, 乌梅、黄连、黄芪、玄参为其主要成分药

物, 连梅颗粒发挥药效主要是以君药和臣药协同, 与中医理论相符。连梅颗粒组成药物对高血压、心力衰竭、心肌梗塞体现出强大的药理作用, 与本次预测结果相符合。

**3.2 连梅颗粒筛选的活性成分对心血管疾病的药效作用** 连梅颗粒的重要活性成分包括黄酮类(槲皮素、鼠李糖苷)、酚酸类(香草酸)、酚类(丁香酚)、内酯类(对香豆酸)、苯丙酸类(阿魏酸)等。其中, 香草酸和槲皮素可能是连梅颗粒活性较大的两个成分。黄酮类化合物对心脏有益, 具有扩张冠状血管、改善心肌供血量、降低血脂等作用<sup>[9]</sup>。槲皮素抑制心力衰竭心脏纤维化、炎症、增强心肌收缩力、降低患者的动态血压、提高心肌梗塞患者生活能力和抗氧化能力<sup>[10]</sup>。香草酸在高血压、心肌梗塞模型中可以通过抗氧化、抗炎等作用保护线粒体功能、抗凋亡等发挥保护作用<sup>[9]</sup>。连梅颗粒其他成分如鼠李糖苷、香草酸、丁香酚、对香豆酸、阿魏酸等均可发挥保护缺氧/复氧细胞模型氧化损伤和线粒体功能损伤、炎症、抗血栓形成、抑制心室重塑过程和调节免疫力的作用<sup>[11-12]</sup>, 连梅颗粒筛选活性成分均显示出对高血压、心力衰竭、心肌梗塞疾病的药理作用。

**3.3 连梅颗粒活性成分治疗心血管疾病的潜在药靶和作用机制** 巨噬细胞迁移抑制因子(MIF)和 Toll 样受体 9(TLR9)可能是连梅颗粒活性成分发挥药效的关键靶点。MIF 被表征为一种炎症细胞因子和非典型趋化因子, 可保护心脏免受心肌缺血-再灌注损伤等<sup>[13]</sup>, 减少再灌注损伤期间心肌细胞凋亡, 与心脏缺血心脏面积以及心肌能量代谢、老年心梗患者预后相关, 逐渐成为心血管疾病治疗的一个潜在的靶点<sup>[14]</sup>。TLR9 主要在心肌中表达, 具有抑制心脏代谢疾病的潜力, 参与心肌细胞线粒体代谢、右心室功能障碍、心肌收缩力和炎症调节过程<sup>[15]</sup>, TLR9 消融可以预防心脏肥大和 HF。进一步分析其机制, 值得注意的是其与心肌能量代谢相关的信号通路。cAMP 通路的抑制或者破坏, 会触发细胞线粒体含量的降低, 因此, 胞内 cAMP 浓度的增加会诱导线粒体酶活性和线粒体细胞色素的增加, 从而增加细胞的 ATP 水平, 以保持线粒体正常形态、维持细胞能量产生功能<sup>[16]</sup>。cAMP 激活心肌细胞中的 PKA 表达, PKA 介导的磷酸化进一步调节 Ca<sup>2+</sup>信号, Ca<sup>2+</sup>信号传导对心脏细胞功能至关重要。Ca<sup>2+</sup>信号传导调节线粒体 ATP 合成的蛋白质, 从而刺激 ATP 的合成<sup>[17]</sup>。过氧化物酶体增殖物激活受体(PPAR)是核激素受体, 为用于治疗各种疾病(包括由能量代谢受损引起的心血

管疾病)的治疗手段的有希望的药理学靶标<sup>[18]</sup>。PPAR $\alpha$ 在心肌细胞中高表达,PPAR $\alpha$ 作为AMPK的下游靶标,AMPK的激活通过增加PPAR $\alpha$ 靶基因在细胞中的表达增加来增强有氧呼吸功能,该理论在体外心衰动物模型和临床心衰患者试验中发现降低的PGC-1 $\alpha$ 和PPAR $\alpha$ 磷酸化得到验证<sup>[19]</sup>。综上,目前尚未有相关报道香草酸、槲皮素与MIF、TLR9的作用,基于香草酸、槲皮素与MIF、TLR9在心血管疾病中相一致的作用,以及结合分子对接预测结果,本次研究首次预测并认为,高血压、心力衰竭和心肌梗塞可能是连梅颗粒活性成分香草酸和槲皮素通过MIF、TLR9靶蛋白起到治疗作用的心血管疾病,其机制涉及心肌能量代谢相关的信号通路包括cAMP信号通路、钙信号通路和PPAR信号通路,但仍有待进一步实验研究。

#### 参考文献:

- [1] MAHMOOD S S, LEVY D, VASAN R S, et al. The framingham heart study and the epidemiology of cardiovascular disease: a historical perspective[J]. *Lancet*, 2014, 383(9921): 999-1008.
- [2] SHEN C, GE J. Epidemic of cardiovascular disease in China: current perspective and prospects for the future[J]. *Circulation*, 2018, 138(4): 342-344.
- [3] 李明强. 连梅颗粒抗动脉粥样硬化的机制研究[D]. 广州: 广州中医药大学, 2017.
- [4] 李琰. 加味连梅颗粒对实验性肥胖2型糖尿病大鼠糖脂代谢及心肌组织PAI-1表达的影响[D]. 长春: 长春中医药大学, 2012.
- [5] NIMAVAT N, SINGH S, FICHADIYA N, et al. Online medical education in India-different challenges and probable solutions in the age of COVID-19[J]. *Adv Med Educ Pract*, 2021, 12: 237-243.
- [6] WU J, LUO Y, DENG D, et al. Coptisine from *Coptis chinensis* exerts diverse beneficial properties: a concise review[J]. *J Cell Mol Med*, 2019, 23(12): 7946-7960.
- [7] JUNXIA S, YUHUI W, MINGLONG L, et al. Anti-hyperuricemic and nephroprotective effects of *Rhizoma Dioscoreae septemlobae* extracts and its main component dioscin via regulation of mOAT1, mURAT1 and mOCT2 in hypertensive mice[J]. *Arch Pharm Res*, 2014, 37(10): 1336-1344.
- [8] ZHANG R, HUANG B, Du D, et al. Anti-thrombosis effect of diosgenyl saponins in vitro and in vivo[J]. *Steroids*, 2013, 78(11): 1064-1070.
- [9] 马文芳. 香草酸抑制血管内皮细胞氧化应激的作用机制研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2019.
- [10] DEGHANI F, SEZAVAR S J S, JANANI L, et al. Effects of quercetin supplementation on inflammatory factors and quality of life in post-myocardial infarction patients: a double blind, placebo-controlled, randomized clinical trial[J]. *Phytother Res*, 2021, 35(4): 2085-2098.
- [11] WU H, ZHAO G, JIANG K, et al. Engeletin alleviates lipopolysaccharide-induced endometritis in mice by inhibiting TLR4-mediated NF- $\kappa$ B activation[J]. *J Agric Food Chem*, 2016, 64(31): 6171-6178.
- [12] DIANAT M, RADMANESH E, BADAVI M, et al. Disturbance effects of PM(1)(0) on iNOS and eNOS mRNA expression levels and antioxidant activity induced by ischemia-reperfusion injury in isolated rat heart: protective role of vanillic acid[J]. *Environ Sci Pollut Res Int*, 2016, 23(6): 5154-5165.
- [13] STOPPE C, AVERDUNK L, GOETZENICH A, et al. The protective role of macrophage migration inhibitory factor in acute kidney injury after cardiac surgery[J]. *Sci Transl Med*, 2018, 10(441): eaan4886.
- [14] TILSTAM P V, QI D, LENG L, et al. MIF family cytokines in cardiovascular diseases and prospects for precision-based therapeutics [J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2017, 21(7): 671-683.
- [15] BOUCHEZ C, DEVIN A. Mitochondrial biogenesis and mitochondrial reactive oxygen species(ROS): a complex relationship regulated by the cAMP/PKA signaling pathway[J]. *Cells-Basel*, 2019, 8(4): 287.
- [16] VALSECCHI F, RAMOS-ESPIRITU L S, BUCK J, et al. cAMP and mitochondria[J]. *Physiology (Bethesda)*, 2013, 28(3): 199-209.
- [17] ROSSI A, PIZZO P, FILADI R. Calcium, mitochondria and cell metabolism: a functional triangle in bioenergetics[J]. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*, 2019, 1866(7): 1068-1078.
- [18] KHUCHUA Z, GLUKHOV A I, STRAUSS A W, et al. Elucidating the beneficial role of PPAR agonists in cardiac diseases [J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(11): 3464.
- [19] CHEN X, WANG Q, SHAO M, et al. Ginsenoside Rb3 regulates energy metabolism and apoptosis in cardiomyocytes via activating PPAR $\alpha$  pathway[J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 120: 109487.

(编辑: 修春)