

本文引用:张 星,李 晓,周国锋,陈纪烨,王永成,彭 波,董 峰,林海青.基于网络药理学的枳实薤白桂枝汤治疗冠心病的分子机制研究[J].湖南中医药大学学报,2020,40(5):571-577.

基于网络药理学的枳实薤白桂枝汤治疗 冠心病的分子机制研究

张 星¹,李 晓²,周国锋¹,陈纪烨¹,王永成²,彭 波²,董 峰²,林海青^{2*}

(1.山东中医药大学,山东 济南 250014;2.山东中医药大学附属医院,山东 济南 250011)

[摘要] **目的** 基于网络药理学方法研究枳实薤白桂枝汤治疗冠心病的作用机制。**方法** 利用中药系统药理学数据库(TCMSP)筛选与枳实薤白桂枝汤相关的化学成分及其作用靶点;通过 OMIM 和 NCBI 数据库获取与冠心病相关的靶点,将疾病靶点与药物靶点进行交集,筛选得到疾病-药物成分共同靶蛋白。应用 STRING 平台构建蛋白-蛋白相互作用(PPI)网络模型;利用 Cytoscape 软件构建“复方-活性成分-作用靶点-疾病”相互作用网络;运用 R 语言进行 KEGG 通路和 GO 功能富集分析。**结果** 经数据库分析共获得了 1 801 个疾病靶点,42 个药物作用靶点。对其中 26 个共同相关靶点(占枳实薤白桂枝汤靶点的 62%)进行分析,发现共有 119 个生物学过程及 58 条通路被显著富集。**结论** 枳实薤白桂枝汤治疗冠心病具有多靶点、多通路的特点。其作用机制可能与调控冠心病发展过程中细胞代谢与凋亡、脂质代谢等过程有关。

[关键词] 枳实薤白桂枝汤;冠心病;靶点;通路;网络药理学

[中图分类号] R256.22

[文献标志码] A

[文章编号] doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2020.05.012

Molecular Mechanism of Zhishi Xiebai Guizhi Decoction in Treatment of Coronary Heart Disease Based on Network Pharmacology

ZHANG Xing¹, LI Xiao², ZHOU Guofeng¹, CHEN Jiye¹, WANG Yongcheng², PENG Bo², DONG Feng², LIN Haiqing^{2*}

(1. Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan, Shandong 250014, China; 2. The Affiliated Hospital of Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan, Shandong 250011, China)

[Abstract] **Objective** To analyze the action mechanism of Zhishi Xiebai Guizhi Decoction in the treatment of coronary heart disease based on network pharmacology. **Methods** TCMSP was used to select the chemical compounds and the effect targets related to the Zhishi Xiebai Guizhi Decoction; The targets related to coronary heart disease were screened through OMIM and NCBI databases. The common targets of disease-drug component were selected by intersecting disease targets with drug targets. A protein-protein interaction (PPI) network model was constructed using the STRING platform. The "Compound-Active Compounds-Targets-Disease" interaction network was constructed by Cytoscape software. Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway and Gene Ontology (GO) functional enrichment analysis were performed by R language. **Results** A total of 1801 disease targets and 42 drug targets were screened out by network analysis. For 26 of the common targets (62% of the target of Zhishi Xiebai Guizhi Decoction) were analyzed. A total of 119 biological processes and 58 pathways were found to be significantly enriched. **Conclusion** Zhishi Xiebai Guizhi Decoction in the treatment of coronary heart disease has the characteristics of multiple targets and multiple pathways. Its mechanism may be related to the regulation of cell metabolism

[收稿日期] 2019-11-09

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81673970)。

[作者简介] 张 星,男,在读硕士研究生,研究方向:心血管疾病的中西医结合诊疗、心肌微血管损伤与自主神经重构研究。

[通讯作者] *林海青,男,副主任药师,E-mail:linhaiqing707@163.com。

and apoptosis, lipid metabolism and other processes in the development of coronary heart disease.

[**Keywords**] Zhishi Xiebai Guizhi Decoction; coronary heart disease; targets; pathway; network pharmacology

冠心病的主要特征是冠状动脉狭窄甚至梗阻,诱发冠脉功能改变,最终导致心肌缺血或坏死^[1]。世界卫生组织最新统计数据表明,2012年全球有740万人死于冠心病^[2]。冠心病的治疗常需采用昂贵的外科手术,而且伴随手术风险较高的代价,已成为影响人们生命质量的重要危险因素。

冠心病属于中医学“胸痹”“真心痛”的范畴。医圣张仲景在《金匮要略》记录了冠心病治疗的研究,提出“胸痹心中痞气,气结在胸,胸满,胁下逆抢心,枳实薤白桂枝汤主之”,创立了枳实薤白桂枝汤。方中的枳实、厚朴功在开痞散结,下气除满;桂枝上可宣通心胸之阳,下以温化中下二焦之阴气,既通阳又降逆。降逆则阴寒之气不会上逆,通阳则阴寒之气不会内结。胡镜清等^[3]结合《金匮要略》成书年代以及“痰”的历史发展渊源,认为方中的瓜蒌性苦寒滑润,功专开胸行气;并以温通滑利、通阳行气止痛之薤白为辅,驱逐寒浊之邪使之下行,遵“心伤宜食薤”之经旨;对于阳气不通、阴邪为胜的胸痹疗效显著。

近年来研究证实,枳实薤白桂枝汤治疗冠心病取得一定临床效果,特别是其与西药的联合应用,临床上取得了较为显著的疗效^[4-5]。研究表明,枳实薤白桂枝汤联合瑞舒伐他汀治疗老年冠心病的疗效确切,可减轻患者的高炎症状态及氧化应激反应,改善心脏功能^[6]。枳实薤白桂枝汤能够改善冠心病合并高脂血症患者临床症状,并能修复内皮功能及改善脂代谢^[7]。枳实薤白桂枝汤联合西药可有效治疗血瘀、痰浊为主的不稳定性心绞痛患者^[8]。前期研究表明枳实薤白桂枝汤是治疗冠心病的有效中药复方,但是对于其具体作用机制尚不明确。

本研究基于网络药理学对枳实薤白桂枝汤治疗冠心病的作用靶点、通路进行了探索,旨在揭示其从痰、寒论治冠心病的分子机制,从而为临床研究提供研究依据。

1 材料与方法

1.1 冠心病靶点的筛选

从人类孟德尔遗传数据库(OMIM, <http://www.omim.org/>)、美国国立生物技术信息中心数据库(NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>),搜索关键词“冠状动脉粥样硬化性心脏病”的官方英文名称“coronary heart disease”,获得疾病相关靶点。

1.2 枳实薤白桂枝汤靶点的筛选

通过TCMSP数据库依次检索枳实、薤白、桂枝、

瓜蒌、厚朴,并筛选口服利用度(OB)≥30%且类药性(DL)≥0.18的药物成分,并将相关靶点用Uniprot数据库处理,以确保靶点的规范化,建立靶点数据集,构建药物成分作用靶点数据集。

1.3 药物-疾病靶点网络构建

将疾病靶点与枳实薤白桂枝汤的靶点使用R语言(版本3.6.0)程序进行对比,以此筛选出共同的靶点,同时绘制韦恩图。将得到的疾病药物共同靶点输入STRING 11.0网站(<https://string-db.org>)构建蛋白-蛋白相互作用网络(protein-protein interaction, PPI)^[9-11],物种设为“Homo sapiens”(人类),其余参数保持默认设置,获取相互作用关系,并根据连接度Degree调节节点的大小,绘制PPI网络图。

1.4 交集靶点分析

利用Cytoscape 3.7.1软件的关联功能构建“复方-活性成分-作用靶点-疾病”网络模型。利用Bioconductor平台(<http://bioconductor.org/biocLite.R>)和R语言对获得的基因进行KEGG通路和GO功能富集分析。

2 结果

2.1 冠心病靶点数据库的筛选

基于OMIM以及NCBI数据库,输入关键词“coronary heart disease”初步得到1984个相关靶点,去除重复后保留1801个靶点。

2.2 枳实薤白桂枝汤靶点的筛选

基于TCMSP数据库,得到53个活性化合物(见表1),其中厚朴2个、枳实22个、薤白11个、瓜蒌11个、桂枝7个(其中重复2个)。初步得到151个靶点,由于化合物靶点存在多重对应关系,筛选后最终确定42个唯一靶点。

2.3 枳实薤白桂枝汤治疗冠心病相关靶点预测和PPI网络构建

将42个药物预测靶点与1984个冠心病相关性靶点,作为候选子集录入R中,交集中共同靶点有26个。将共有的26个靶点导入STRING数据库中,设置中度置信度,最小互作需求得分(minimum-required interaction score)为0.400,最终得出101个作用关系,构建PPI网络(见图1),得到EGFR、PPARG、CASP3等关键靶点。应用Cytoscape(3.7.1)软件构建枳实薤白桂枝汤主要药物成分-靶点-复方-疾病网络拓扑图(见图2)。

表 1 枳实薤白桂枝汤主要活性成分基本信息表

MOL ID	化合物名称	来源药物	OB/%	DL
MOL005970	eucalyptol	厚朴	60.62	0.32
MOL005980	neohesperidin	厚朴	57.44	0.27
MOL013276	poncirin	枳实	36.55	0.74
MOL013277	Isosinensetin	枳实	51.15	0.44
MOL013279	5,7,4'-trimethylapigenin	枳实	39.83	0.30
MOL013428	isosakuranetin-7-rutinoside	枳实	41.24	0.72
MOL013430	prangenin	枳实	43.60	0.29
MOL013433	prangenin hydrate	枳实	72.63	0.29
MOL013435	poncimarín	枳实	63.62	0.35
MOL013436	isoponcimarín	枳实	63.28	0.31
MOL013437	6-methoxy aurapten	枳实	31.24	0.30
MOL013440	citrusin B	枳实	40.80	0.71
MOL001798	neohesperidin_qt	枳实	71.17	0.27
MOL001803	sinensetin	枳实	50.56	0.45
MOL001941	ammidin	枳实	34.55	0.22
MOL013352	obacunone	枳实	43.29	0.77
MOL002914	eriodyctiol (flavanone)	枳实	41.35	0.24
MOL004328	naringenin	枳实	59.29	0.21
MOL005100	5,7-dihydroxy-2-(3-hydroxy-4-methoxyphenyl)chroman-4-one	枳实	47.74	0.27
MOL005828	nobiletin	枳实	61.67	0.52
MOL005849	didymin	枳实	38.55	0.24
MOL000006	luteolin	枳实	36.16	0.25
MOL007879	tetramethoxyluteolin	枳实	43.68	0.37
MOL009053	4-[(2S,3R)-5-[(E)-3-hydroxyprop-1-enyl]-7-methoxy-3-methylol-2,3-dihydrobenzofuran-2-yl]-2-methoxy-phenol	枳实	50.76	0.39
MOL001973	Sitosteryl acetate	薤白	40.39	0.85
MOL002341	hesperetin	薤白	70.31	0.27
MOL000332	n-coumaroyltyramine	薤白	85.63	0.20
MOL000358	beta-sitosterol	薤白	36.91	0.75
MOL004328	naringenin	薤白	59.29	0.21
MOL000483	(Z)-3-(4-hydroxy-3-methoxy-phenyl)-N-[2-(4-hydroxyphenyl)ethyl]acrylamide	薤白	118.35	0.26
MOL000631	coumaroyltyramine	薤白	112.90	0.20
MOL007640	macrostemonoside_e_qt	薤白	35.26	0.87
MOL007650	PGA(sup 1)	薤白	43.98	0.25
MOL007651	prostaglandin B1	薤白	40.21	0.25
MOL000098	quercetin	薤白	46.43	0.28
MOL001494	mandenol	瓜蒌	42.00	0.19
MOL002881	diosmetin	瓜蒌	31.14	0.27
MOL004355	spinasterol	瓜蒌	42.98	0.76
MOL005530	hydroxygenkwanin	瓜蒌	36.47	0.27
MOL006756	schottenol	瓜蒌	37.42	0.75
MOL007165	10 α -cucurbita-5,24-diene-3 β -ol	瓜蒌	44.02	0.74
MOL007171	5-dehydrokarounidiol	瓜蒌	30.23	0.77
MOL007172	7-oxo-dihydrokaro-unidiol	瓜蒌	36.85	0.75
MOL007175	karounidiol 3-o-benzoate	瓜蒌	43.99	0.50
MOL007179	linolenic acid ethyl ester	瓜蒌	46.10	0.20
MOL007180	vitamin-e	瓜蒌	32.29	0.70
MOL001736	(-)-taxifolin	桂枝	60.51	0.27
MOL000358	beta-sitosterol	桂枝	36.91	0.75
MOL000359	sitosterol	桂枝	36.91	0.75
MOL000492	(+)-catechin	桂枝	54.83	0.24
MOL000073	ent-Epicatechin	桂枝	48.96	0.24
MOL004576	taxifolin	桂枝	57.84	0.27
MOL011169	peroxyergosterol	桂枝	44.39	0.82

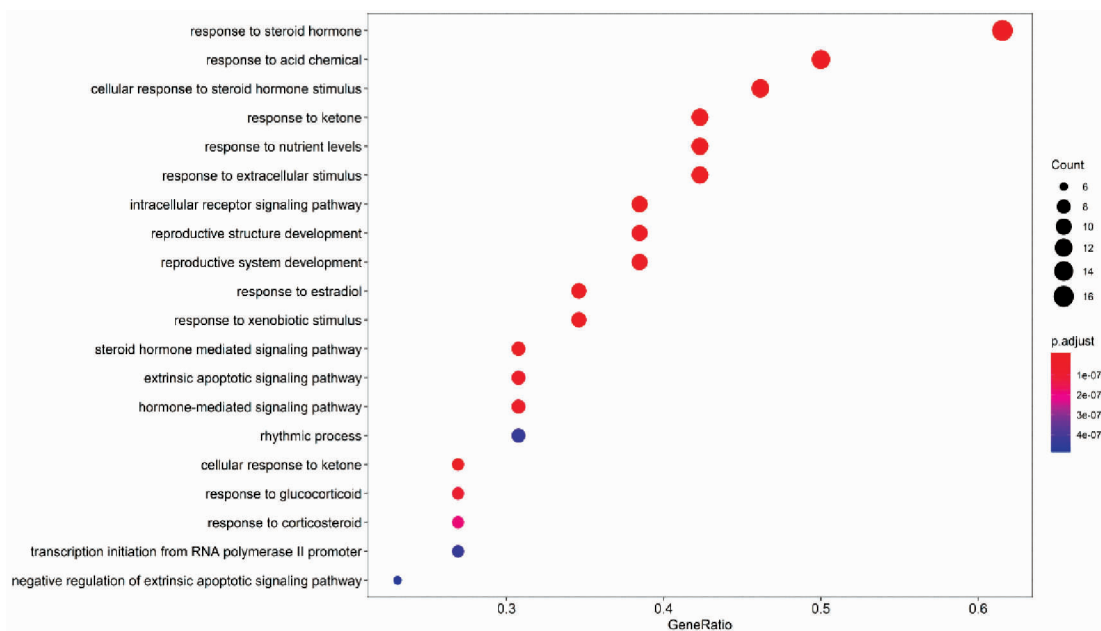


图 3 GO 生物学过程气泡图

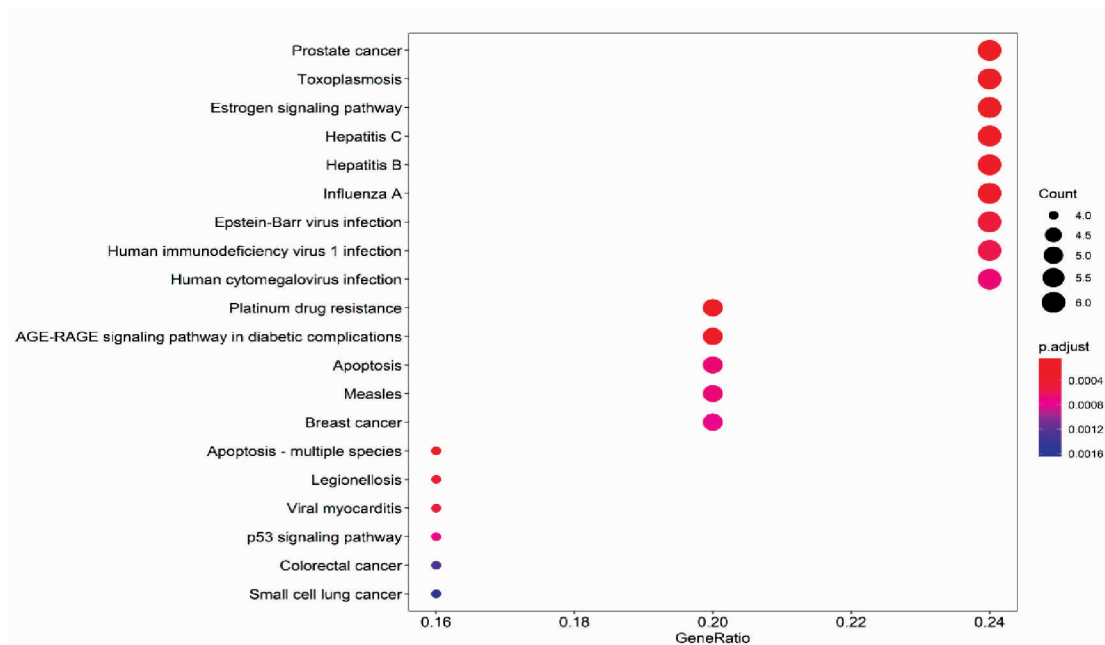


图 4 KEGG 通路气泡图

栓塞^[16-17],最终引发血管性疾病。

枳实薤白桂枝汤是中医临床治疗冠心病的经典方。现代研究^[18-20]表明,枳实具有抗炎作用,其成分可以抑制炎症因子的释放,减轻血管内皮损伤;薤白可显著降低高脂血症患者血清总胆固醇和低密度脂蛋白含量,降低甘油三酯水平,缩小动脉粥样斑块的厚度;同时,薤白提取物可以抑制平滑肌细胞的增生,从而抗动脉粥样硬化;瓜蒌可舒张冠状动脉,改善冠脉血流量,促进血小板解聚并防止其凝聚,增强机体耐缺氧能力;桂枝可促进心肌收缩。厚朴具有抑制血小板聚集和 ATP 释放、松弛平滑肌的

作用。枳实薤白桂枝汤对血液流变学异常也有较好的改善作用,能提高血管内皮细胞抗氧化能力,尤其在血管内皮细胞损伤的保护、高凝状态抑制等方面有一定优势^[21]。

本文应用网络药理学研究方法,通过对枳实薤白桂枝汤治疗冠心病的靶点进行数据挖掘与分析,构建了“复方-活性成分-作用靶点-疾病”网络和 PPI 网络,发现各蛋白靶点之间关系密切,提示药物作用机制复杂多样,非单一蛋白靶标作用而成。对 PPI 网络中关键靶点进行分析,其中 EGFR 是一种酪氨酸激酶受体,其变异与血糖和甘油三酯水平相

关^[22],提示可能通过降低血糖与血脂保护血管内膜,进而延缓冠状动脉粥样硬化的发展;PPARG是参与脂质调节的关键因素,作为冠心病的候选基因既往已引起了广泛关注^[23]。网络中PPARG自由度相对较高,即由PPARG直接参与的生物过程较多,提示其在整个治疗中所具有的生物学重要性较大。CASP3在细胞凋亡中起着关键作用^[24],当细胞线粒体膜损伤时,线粒体的细胞色素释放出来,释放到细胞外,激活CASP3从而诱导细胞凋亡^[25]。提示枳实薤白桂枝汤在保护血管内膜以及调节脂质代谢方面发挥作用。

通过对枳实薤白桂枝汤的GO功能富集分析可见,其主要富集的生物学过程包含对类固醇激素的反应、对脂肪酸的反应,以及胆固醇、脂肪酸等的代谢过程,外在凋亡信号通路等。由此可推测,枳实薤白桂枝汤可通过调节基因表达,免疫与代谢以及抗炎修复等过程来治疗冠心病,其中尤其体现在调控脂质代谢的过程。

KEGG通路富集分析发现4个关键靶点:CASP9、CASP3、CASP8、RELA,几乎每条关键通路都有他们的参与。既往研究证实,CASP3在细胞凋亡中起着关键作用^[24],与心律失常和心肌细胞凋亡有着密切关系^[26],当细胞线粒体膜损伤时,线粒体的细胞色素释放出来,释放到细胞外,激活CASP3从而诱导细胞凋亡^[25]。而CASP8、CASP9与细胞凋亡的起始有关。RELA基因对细胞的炎症反应、免疫应答等过程具有关键作用。关键通路包括p53信号通路、雌激素信号通路、细胞凋亡通路、血管内皮生长因子通路。研究体外细胞实验和整体动物实验时发现,缺氧、缺血和缺血再灌注损伤过程中,p53基因的表达都会增加;其他研究也提示p53基因在高血压、动脉粥样硬化、心肌梗死等心血管疾病的进展中发挥着重要作用^[27-28]。抑制p53信号通路的激活将会成为防治心力衰竭的重要靶点^[29];任良强等^[30]提出雌激素信号通路是中药薤白作用冠心病的最主要通路。本方中薤白作为君药,尤其对缓解冠心病过程中胸闷胸痛具有重要意义。细胞凋亡通路对心室重塑具有重要意义,是影响动脉粥样硬化以及最终的心力衰竭的关键环节,在枳实薤白桂枝汤治疗过程中亦发挥出显著作用;许多研究均表明血管内皮生长因子与冠状动脉的病变程度以及预后密切相关,能

反应心肌的缺血程度^[31],可显著增加侧枝依赖性缺血心肌的血流。对冠心病过程中一过性心绞痛以及心前区压榨性疼痛感具有缓解作用。

综上所述,可以预测枳实薤白桂枝汤通过作用于CASP9、CASP3、CASP8、RELA等关键靶点参与抑制炎症破坏,减轻血管内膜损伤的过程。调控p53信号通路、雌激素信号通路、细胞凋亡通路、血管内皮生长因子通路等发挥善血液循环、延缓心室重塑,防治心力衰竭的作用,为枳实薤白桂枝汤治疗冠心病的进一步研究提供了实验基础。

参考文献

- [1] 范秀珍.内科护理学[M].北京:中国协和医科大学出版社,2004.
- [2] 蒋世忠.基于球模型的三维冠状动脉中心线抽取方法研究[D].广州:华南理工大学,2014.
- [3] 许伟明,胡镜清,江丽杰.《金匱要略》瓜蒌薤白三方治胸痹原意探析[J].中华中医药杂志,2017,32(5):2288-2290.
- [4] 郭文贤,李亮,成金乐,等.参斛复方中药破壁饮片治疗冠心病的临床疗效研究[J].中药材,2017,40(8):1962-1964.
- [5] 姜众会,高铸焯.中医药防治稳定型冠心病的特色[J].中西医结合心脑血管病杂志,2018,16(2):243-245.
- [6] 陈超,刘昊阳,黄少松.枳实薤白桂枝汤联合瑞舒伐他汀治疗老年冠心病的疗效[J].中国合理用药探索,2019,16(8):19118-19121.
- [7] 刘宇,邵金博,郭立中.枳实薤白桂枝汤治疗冠心病合并高脂血症的疗效及对内皮功能和脂代谢的影响[J].中药材,2018,41(2):476-478.
- [8] 戴飞,陆曙,苏伟,等.枳实薤白桂枝汤对不稳定型心绞痛患者MMP-9/TIMP-1的影响[J].中国实验方剂学杂志,2013,19(14):307-310.
- [9] CHENG X R, CUI X L, ZHENG Y, et al. Nodes and biological processes identified on the basis of network analysis in the brain of the senescence accelerated mice as an Alzheimer's disease animal model[J]. Frontiers in Aging Neuroscience, 2013,5:1-19.
- [10] CHRISTIAN V M, JENSEN L J, BEREND S, et al. STRING: known and predicted protein-protein associations, integrated and transferred across organisms[J]. Nucleic Acids Research, 2005, 33 (suppl 1): D433-D437.
- [11] 雷奇林,黄雅兰,钟茜,等.基于网络药理学的黄芩抗炎作用机制研究[J].中草药,2018,49(15):3463-3561.
- [12] YU G, WANG L G, HAN Y, et al. cluster profiler: an R Package for comparing biological themes among gene clusters[J]. Omics A Journal of Integrative Biology, 2012, 16(5):284-287.
- [13] 崔鸣,陈凤荣,宋清华,等.氨氯地平抑制氧化型胆固醇诱导的血管内皮细胞凋亡[J].中国病理生理杂志,2001,17(2):104-107.
- [14] 许伟明,胡镜清,彭锦,等.肥胖与痰瘀互结病机关系论析[J].环

- 球中医药,2015,8(6):654-657.
- [15] 刘燕君,胡镜清,江丽杰.冠心病痰瘀互结分子生物学机理研究现状[J].世界科学技术—中医药现代化,2016,18(5):791-799.
- [16] GUO M L, GUO L L, QIN Q J, et al. The molecular mechanism of serum microRNA124b induced coronary heart disease by inducing myocardial cell senescence[J]. *European Review for Medical & Pharmacological Sciences*, 2018, 22(7):2070-2076.
- [17] 夏寒星,张 业.枳实薤白桂枝汤对高脂血症大鼠血液流变学指标及抗氧化作用的影响[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(11):170-172.
- [18] 石 姗,孔祥英.枳实薤白桂枝汤治疗冠心病心绞痛的研究进展[J].世界最新医学信息文摘,2018,18(45):111-112.
- [19] 魏慧渊,陈 浩,苏 伟,等.枳实薤白桂枝汤治疗不稳定型心绞痛 30 例[J].中国中医急症,2011,20(3):462-463.
- [20] 石月萍,马 骏.加减枳实薤白桂枝汤治疗冠心病心绞痛[J].辽宁中医杂志,2009,36(6):962-963.
- [21] LIN B, ZHU M, WANG W, et al. Structural basis for alpha fetoprotein-mediated inhibition of caspase-3 activity in hepatocellular carcinoma cells[J]. *International Journal of Cancer*, 2017, 141: 1413-1421.
- [22] XU W J, XU J H, SUN B, et al. The effect of PPARG gene polymorphisms on the risk of coronary heart disease: a meta-analysis[J]. *Molecular Biology Reports*, 2013, 40: 875-884.
- [23] HULYA YILMAZ-AYDOGAN, OZLEM KURNAZ, OZLEM KUCUKHUSEYIN, et al. Different effects of PPARA, PPARG and ApoE SNPs on serum lipids in patients with coronary heart disease based on the presence of diabetes[J]. *Gene*, 2013, 523(1):20-6.
- [24] LIN B, ZHU M, WANG W, et al. Structural basis for alpha fetoprotein-mediated inhibition of caspase-3 activity in hepatocellular carcinoma cells[J]. *International journal of cancer*, 2017, 141:1413-1421.
- [25] LAKHANI S A, MASUD A, KUIDA K, et al. Caspases 3 and 7: key mediators of mitochondrial events of apoptosis[J]. *Science*, 2006, 311:847-851.
- [26] 聂园园,仇小强.心肌细胞凋亡与心血管疾病关系的研究进展[J].实用医学杂志,2012,28(2):324-326.
- [27] XIE Z, KOYAMA T, ABE K, et al. Upregulation of P53 protein in rat heart subjected to a transient occlusion of the coronary artery followed by reperfusion[J]. *Japanese Journal of Physiology*, 2000, 50(1):159-162.
- [28] 常 宏,田立茹,李佳凝,等.p53 信号通路在心力衰竭中的作用机制[J].华北理工大学学报(医学版),2019,21(1):76-80,84.
- [29] 赵 阳,郑景辉,徐文华,等.基于系统药理学和分子对接研究薤白治疗冠心病的作用机制[J].中华中医药学刊,2020,38(1):105-109,272-274.
- [30] 任良强,吴 忠,廖 旺,等.经皮冠状动脉介入治疗对冠心病合并左心功能不全患者 VEGF、ADAMTS4 及心功能的影响[J].解放军医药杂志,2019,31(3):80-83.
- [31] BEKLER A, GAZI E, YILMAZ M, et al. Could elevated platelet-lymphocyte ratio predict left ventricular systolic dysfunction in patients with non-ST elevated acute coronary syndrome?[J]. *The Anatolian Journal of Cardiology*, 2015, 15(5):385-390.

(本文编辑 苏 维)