

本文引用: 郑清华, 刘一卓, 秦子镒, 邱璐, 郑相颖, 王显. 基于网络药理学和细胞实验探讨络风宁2号方治疗心力衰竭的作用机制[J]. 湖南中医药大学学报, 2025, 45(12): 2296-2306.

基于网络药理学和细胞实验探讨络风宁2号方 治疗心力衰竭的作用机制

郑清华¹, 刘一卓¹, 秦子镒¹, 邱璐¹, 郑相颖^{2*}, 王显^{3,4*}

1.北京中医药大学东直门医院,北京 100700;2.北京中医药大学东直门医院心内科,北京 100700;

3.北京中医药大学东直门医院心血管中心,北京 100700;4.北京中医药大学心血管病研究院,北京 100700;

【摘要】目的 探究络风宁2号方(LFN2)治疗心力衰竭的作用机制。**方法** 通过TCMSP和SwissTargetPrediction数据库搜索LFN2的活性成分及作用靶点,利用GeneCards和OMIM数据库收集心力衰竭相关疾病靶点;通过Venny 2.1.0在线平台确定LFN2与心力衰竭的交集靶点后导入STRING数据库构建蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)网络,借助Cytoscape 3.9.1软件绘制“药物-成分-靶点”网络图,利用R语言,进行GO功能富集与KEGG通路富集分析。采用分子对接验证LFN2活性成分与核心靶点的结合能力。通过细胞实验对筛选cAMP/Drp1及细胞凋亡通路进行验证;将细胞分为对照组、模型组、LFN2组、Db-cAMP组、LFN2+Db-cAMP组,分别检测各组ANP/BNP mRNA及cAMP、Drp1及细胞凋亡相关蛋白cleaved Caspase-3、Bcl-2、Bax的表达情况。**结果** 网络药理学筛选出157个活性成分及553个作用靶点。KEGG通路富集分析主要与Wnt信号通路、Rap1信号通路、MAPK信号通路、PPAR信号通路、cAMP信号通路、胰高血糖素信号通路、肾素分泌通路密切相关。PPI网络显示,AKT1、ALB、TNF等为核心靶点,分子对接结果显示,主要成分Ginsenoside Rh4、Biatractylolide、Danshenxinkun D和Tumulosic acid与核心靶点GAPDH、TNF、IL6、AKT1、ALB的结合能均 ≤ -5.10 kJ/mol。细胞实验表明,与对照组相比,模型组ANP/BNP mRNA表达升高($P < 0.01$),cAMP含量下降($P < 0.05$),Drp1荧光强度及蛋白增多($P < 0.05$),促凋亡蛋白cleaved Caspase-3、Bax显著升高($P < 0.01$),抗凋亡蛋白Bcl-2下降($P < 0.05$);与模型组相比,LFN2组、Db-cAMP组、LFN2+cAMP组ANP/BNP mRNA含量下降($P < 0.05$),cAMP含量升高($P < 0.05$),Drp1荧光及蛋白降低($P < 0.05$),抗凋亡蛋白Bcl-2增多($P < 0.05$),且LFN2+Db-cAMP组改善程度优于LFN2组。**结论** LFN2可能通过调控cAMP/Drp1信号通路,抑制心肌细胞凋亡,发挥抗心力衰竭的作用。

【关键词】 心力衰竭;络风宁2号方;网络药理学;cAMP;Drp1;细胞凋亡

【中图分类号】R285.5

【文献标志码】A

【文章编号】doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2025.12.008

Mechanism of action of Luofengning Formula No.2 in treating heart failure based on network pharmacology and cellular experiments

ZHENG Qinghua¹, LIU Yizhuo¹, QIN Ziyi¹, QIU Lu¹, ZHENG Xiangying^{2*}, WANG Xian^{3,4*}

1. Dongzhimen Hospital, Beijing University of Chinese Medicine, Dongcheng, Beijing 100700, China; 2. Department of Cardiology, Dongzhimen Hospital, Beijing University of Chinese Medicine, Dongcheng, Beijing 100700, China; 3. Cardiovascular Center, Dongzhimen Hospital Affiliated to Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100700, China; 4. Institute of Cardiovascular Diseases, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100700, China

【Abstract】 Objective To explore the mechanism of action of Luofengning No.2 Formula (LFN2) in treating heart failure.

【收稿日期】2025-09-24

【基金项目】北京市科研基地建设项目(2025-JYB-KYPT-05);国家自然科学基金项目(82074263)。

【通信作者】* 王显,男,主任医师,博士生导师,E-mail:wx650515@163.com;郑相颖,女,主治医师,E-mail:zyxing_1109@hotmail.com。

Methods The active components and potential targets of LFN2 were identified using TC MSP and SwissTargetPrediction databases, while heart failure-related disease targets were collected from GeneCards and OMIM databases. Intersecting targets between LFN2 and heart failure were determined using Venny 2.1.0 online platform, then imported into STRING database to construct a protein-protein interaction (PPI) network. Cytoscape 3.9.1 software was used to visualize the "drug-component-target" network. R language was employed for GO functional enrichment analysis and KEGG pathway enrichment analysis. Molecular docking was performed to validate the binding affinity between the active components of LFN2 and the core targets. Cellular experiments were conducted to validate the cAMP/Drp1 and apoptosis pathways. Cells were divided into control, model, LFN2, Db-cAMP, and LFN2+Db-cAMP groups. The expression levels of ANP/BNP mRNA, cAMP, Drp1, and apoptosis-related proteins (cleaved Caspase-3, Bcl-2, and Bax) were measured in each group. **Results** Network pharmacology identified 157 active components and 553 target proteins for LFN2. KEGG pathway enrichment analysis revealed significant associations with the Wnt signaling pathway, Rap1 signaling pathway, MAPK signaling pathway, PPAR signaling pathway, cAMP signaling pathway, glucagon signaling pathway, and renin secretion pathway. PPI network analysis identified AKT1, ALB, and TNF as core targets. Molecular docking results showed that the main active components (Ginsenoside Rh4, Biatractylolide, Danshenxinkun D, and Tumulosic acid) exhibited strong binding affinities (binding energy <math><-5.10\text{ kJ/mol}</math>) with the core targets (GAPDH, TNF, IL6, AKT1, and ALB). Cellular experiments demonstrated that compared with the control group, the model group showed increased ANP/BNP mRNA content ($P<0.01$), decreased cAMP content ($P<0.05$), enhanced Drp1 fluorescence intensity and protein level ($P<0.05$), significantly elevated levels of pro-apoptotic proteins cleaved Caspase-3 and Bax ($P<0.01$), and decreased levels of anti-apoptotic protein Bcl-2 ($P<0.05$). Compared with the model group, the LFN2, Db-cAMP, and LFN2+Db-cAMP groups exhibited reduced ANP/BNP mRNA content ($P<0.05$), increased cAMP content ($P<0.05$), reduced Drp1 fluorescence intensity and protein level ($P<0.05$), and increased Bcl-2 protein level ($P<0.05$). The improvement was more pronounced in the LFN2+Db-cAMP group than in the LFN2 group. **Conclusion** LFN2 may exert anti-heart failure effects by regulating the cAMP/Drp1 signaling pathway and inhibiting cardiomyocyte apoptosis.

[**Keywords**] heart failure; Luofengning Formula No.2; network pharmacology; cAMP; Drp1; apoptosis

心力衰竭是多种心血管疾病发展的终末阶段,以心排量减少、组织灌注不足以及肺循环和/或体循环淤血为主要特征,严重影响患者的生活质量并增加经济负担^[1]。心力衰竭的病理机制颇为复杂,多起因于神经内分泌系统过度激活、炎症因子释放及心肌能量代谢障碍等多因素的相互作用^[2-3]。这些因素协同促进,互为因果,共同引发心室重构、射血功能减退及全身血流动力学异常,从而导致心脏功能进行性衰竭。治疗目标主要以缓解症状、改善生活质量并降低病死率为主^[4],虽然心力衰竭治疗用药不断优化、器械治疗等手段的应用取得显著进展,但仍存在部分患者疗效不佳、出现耐药性及不良反应等问题,尚缺乏能有效逆转疾病进程的治疗手段。

中医学虽无“心力衰竭”病名,但《金匱要略·水气病脉证并治第十四》中记载“心水者,其身重而少气,不得卧,烦而躁,其人阴肿”,即对心力衰竭典型症状的生动描述,故可将心力衰竭归属于“心水病”范畴。心力衰竭发病的始动环节多在于心之气血阴阳亏虚;因虚生风,伏于络脉,滞塞气血津液循行,此为代偿期的关键病机;在此基础上若遇外风引动内

风,导致气血逆乱,则是慢性心力衰竭急性发作的核心环节。中医药在治疗心力衰竭方面体现出多成分、多靶点、整体调节的优势,不仅能改善心力衰竭患者胸闷气短、心悸、胃肠道不适等症状,增强活动耐力,还可调节神经内分泌活性,延缓心室重构,从而提升患者生活质量,并为慢性心力衰竭的长期管理提供更多选择。

络风宁2号方(以下简称 LFN2)在益气活血、温阳利水的传统治法基础上,增加祛风通络之品,方中以鹿衔草息风通络、宣畅气机;黄芪、红参补益心气;丹参、红花活血化瘀;附子、桂枝温通心阳,葶苈子、茯苓泻肺利水^[4],全方共奏益气温阳、活血利水,祛风通络之效。络风与炎症具有一致性已得到医学界的广泛认可^[5],但关于 LFN2 如何介导炎症目前尚无定论。通过网络药理学综合分析药物成分,不仅可以揭示药物与疾病之间的复杂关系,与之相关的靶点及通路,还可以为新药研发提供新的思路和方法^[6]。本研究运用网络药理学的方法,对 LFN2 的关键活性成分、干预心力衰竭发病过程的潜在靶点及与其相关的信号通路进行系统预测与分析;并通过体外

细胞实验验证与心力衰竭相关的潜在信号通路, 期为中医药防治心力衰竭提供新的理论依据和实验支持。

1 LFN2 治疗心力衰竭的网络药理学分析

1.1 中药靶点获取

基于 TCMSMP 数据库, 以口服生物利用度(oral bioavailability, OB)和类药性(drug-likeness, DL)为筛选标准, 筛选出 OB>30%且 DL \geq 0.20 的成分及其相应作用靶点。同时通过文献搜索完善未纳入 TCMSMP 数据库的中药活性成分, 利用 PubChem 数据库将所有活性成分转化为标准的 Canonical SMILES 格式, 通过 SwissTargetPrediction(<http://www.swisstargetprediction.ch/>)数据库搜索 LFN2 成分的靶点, 舍弃重复项, 筛选后得到关键靶点, 最终利用 UniProt 数据库(<http://www.uniprot.org/>), 对各靶点名称进行统一的标准化处理, 即得其对应靶点基因名称。

1.2 心力衰竭靶点筛选

心力衰竭靶点基因的筛选基于 GeneCards (<https://www.genecards.org/>)和 OMIM 数据库(<https://www.omim.org/>), 输入关键词“heart failure”, 检索并搜集有关心力衰竭的靶点, 对结果汇总后删除重复基因, 即得心力衰竭靶基因。对 LFN2 成分与心力衰竭的靶基因取交集并绘制韦恩图, 获得二者的交集靶点即为潜在关键作用靶点。

1.3 核心靶点以及药物-成分-疾病靶点蛋白质-蛋白质相互作用(protein-protein interaction, PPI)网络构建

将上述所得交集靶点导入 STRING(<https://stringdb-orgs.libproxy.xmu.edu.cn:443>), 设定物种选项为“Homo sapiens”, 设置其他参数为默认值, 构建复方成分与心力衰竭的共同靶蛋白的 PPI 网络。导出 PPI 网络图并将结果下载为 TSV 格式文件导入 Cytoscape 3.9.1 对网络进行分析。同时建立有关复方-成分-疾病-靶点对应关系的 Excel 表格, 利用 Cytoscape 3.9.1 软件, 进行网络拓扑结构分析, 绘制“复方-成分-疾病-靶点图”。

1.4 GO 功能和 KEGG 通路富集分析

LFN2 成分与心力衰竭的交集靶点数据基于 R 语言的分析功能进行两个操作, 包括 GO 功能分析和 KEGG 通路富集分析。按校正 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义的标准进行筛选, 并依据基因比例值(Gene-Ratio)由大到小排序, 分别选取 GO 分析前 10 位、KEGG 分析前 20 位的结果进行绘图。

1.5 分子对接

使用分子对接来评估活性成分与其靶点之间的结合强度。根据在 PPI 网络中 MCC 算法排名, 选择前 5 个相关靶点和前 5 的化合物进行分子对接。在 Pubchem 数据库下载核心化合物三维结构 sdf 文件。以关键靶点为受体, 受体的 pdb 文件在 RCSB 数据库中获取。在 Autodock 中进行对接, 统计记录对接分数。

2 材料与仪器

2.1 材料

2.1.1 细胞 H9C2(2-1)心肌细胞购自普诺赛公司, 批号 CL-0089。

2.1.2 主要药物与试剂 LFN2: 购于北京中医药大学东直门医院中药房, 冻干粉制备于北京中医药大学东直门医院通州院区; 多柔比星(doxorubicin, DOX)(上海源叶生物科技有限公司, 批号 25316-40-9); 二丁酰环腺苷酸(dibutyryl cyclic adenosine monophosphate, Db-cAMP)(默沙东有限责任公司, 批号 D0260); DMEM 高糖培养基、青链霉素、胎牛血清(北京永泰兴成商贸有限公司, 批号分别为 PM150210、C100C5、164210); 环磷酸腺苷(cyclic adenosine monophosphate, cAMP)的 ELISA 检测试剂盒(ELabsience, 批号 E-EL-0056); 胰蛋白酶消化液、CCK-8 试剂盒、RNA 快速提取试剂盒、蛋白酶磷酸酶抑制剂、彩色 marker、蛋白上样缓冲液(还原性)、1 \times PBS、RIPA 裂解液、山羊抗兔 IgGH&L(HRP)(苏州新赛美生物科技有限公司, 批号分别为 C100C1、C6005、M51005、P002、P9001、C500C1、WB2001、WB3100、P8002); 动力相关蛋白 1(dynamain-related protein 1, Drp1)(Immunoway 公司, 批号 YM8049)B 细胞淋巴瘤-2(B-cell lymphoma-2, Bcl-2); B 细胞淋巴瘤-2 相关 X 蛋白(Bcl-2-associated X protein, Bax)、活化的半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 3(cleaved cysteine aspartate protease-3, cleaved Caspase-3)(成都正能生物技术有限责任公司, 批号分别为: R381138、R380709、R23726); β -actin 抗体(雅酶公司, 批号 LF201S)。RT-qPCR 试剂盒(美国应用生物系统公司, 批号 A25742); All-in-one RT Super Mix for qPCR 逆转录试剂盒、4%多聚甲醛固定液、抗荧光淬灭封片液(武汉塞维尔生物科技有限公司, 批号分别为: G3337、G1101、G1401); 免疫染色一抗稀释液、4',6-二脒基-2-苯基吲哚二盐酸盐(4',6-diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride, DAPI)、细胞凋亡与坏死试剂盒(上海碧云天生

物技术有限公司,批号分别为 P0103、C1006、C1056)。

2.2 主要仪器

二氧化碳细胞培养箱(Thermo, 3111);实时定量 PCR 仪(赛默飞世尔科技公司, QuantStudio 3);多功能酶标仪(美国 Synergytm 公司, TY2014000272);化学发光成像仪(伯乐生命医学产品有限公司, ChemiDoe Touch V3);Western blot 转膜仪和电泳仪(北京凯元信瑞仪器有限公司, MP-3040);电子显微镜(日本 Olympus Corporation 公司, CKX53)。

3 实验方法

3.1 细胞培养

将 H9C2 心肌细胞接种在培养皿中,待细胞密度贴壁至 90%,用 0.25%胰酶消化并离心,然后添加 10%胎牛血清、青链霉素的 DMEM 重悬细胞,接种到细胞培养瓶中,于 37 °C、5% CO₂ 条件下培养。

3.2 CCK-8 筛选药物浓度

将细胞以 7×10^3 个/孔接种到 96 孔板,贴壁过夜后,根据预实验结果将 DOX 设置成 $0.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的造模条件,孵育 24 h,为了筛选 LFN2 的作用浓度,分别设置 0.1、0.5、1、5、10、50、100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的浓度梯度,在 24 h 时间截点加入 10% CCK-8 溶液 100 μL /孔,避光孵育 1 h 后通过酶标仪在 450 nm 处测定吸光度(OD)值,计算细胞活力。

3.3 细胞分组及给药

采用 CCK-8 筛选药物适宜浓度后进行分组,对照组: H9C2 心肌细胞+完全培养基;模型组:将 $0.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ DOX+H9C2 心肌细胞+完全培养基; LFN2 组: $5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ LFN2+ $0.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ DOX+H9C2 心肌细胞+完全培养基; Db-cAMP 组: $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Db-cAMP+ $0.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ DOX+H9C2 心肌细胞+完全培养基。 LFN2+Db-cAMP 组: $5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ LFN2+ $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Db-cAMP+ $0.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ DOX+H9C2 心肌细胞+完全培养基。

3.4 RT-qPCR 检测 ANP/BNP

收集各组 H9C2 细胞,依据快速 RNA 提取试剂盒加入相应试剂提取细胞 RNA,并测定 RNA 浓度及质量,以 All-in-one RT Super Mix for qPCR 逆转录试剂盒进行反转录放入 PCR 仪中,根据说明书设定程序得到 cDNA,冰上备用。依据 RT-qPCR 试剂盒配置反应体系: 2X qPCR Master Mix 10、上下游引

物各 1 μL 、模板 cDNA 1 μL 、无 RNA 酶水补至 20 μL 。扩增条件: 50 °C, 2 min; 95 °C 预变性 2 min; 95 °C 变性 15 s; 退火 55~60 °C, 15 s; 72 °C 延伸 1 min, 共 40 个循环。依据 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 检测 ANP/BNP mRNA 相对表达水平。TUBLIN 作为内参基因,引物具体序列见下表 1。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

基因名称	序列	引物长度/bp
ANP	GAAGATGCCGCTAGAAGATGAG	373
	AGAGCCCTCAGTTTGCTTTTC	
BNP	CAATCCACGATGCAGAAGCTG	724
	CGCTGTCTTGAGACCTAAGGACT	
TUBULIN	GACCAAGCGTACCATCCACT	1942
	CCACGTACCAGTGCACAAAG	

3.5 ELISA 检测上清中 cAMP 表达量

收集细胞培养基后,将试剂盒所有组分从冰箱中取出,室温下溶解。用标准品稀释液将高浓度 cAMP 标准品进行倍比稀释,并设空白孔、标准品孔、样本孔。每个标准品点和样本均设 3 个复孔,以保证结果的准确性。除空白孔外,每孔立即加入 50 μL 的 cAMP-HRP 结合物。用封板膜封住反应板,37 °C 恒温孵育箱中避光孵育 60 min。揭开封板膜,弃去孔内液体。每孔加满预先配制好的洗涤液,重复洗板 5 次后,将微孔板在吸水纸上拍干。每孔依次加入底物 A 和底物 B 各 50 μL ,轻轻震荡混匀,37 °C 避光孵育,待前三孔溶液颜色应由蓝色立即转为黄色,每孔加入 50 μL 终止液,立即用酶标仪于 450 nm 波长下测量各孔的 OD 值。同时设置 630 nm 作为参比波长进行双波长校正。

3.6 免疫荧光检测 Drp1 蛋白荧光强度

将细胞根据分组处理相应时间后,加入线粒体染色试剂 30 min 后,用 PBS 洗涤细胞两次,加入 4%多聚甲醛固定液固定细胞 30 min, PBST 洗涤细胞,加入 TritonX-100 透化细胞 40 min,再次洗涤细胞,加入 Drp1(1:300),4 °C 孵育过夜,洗涤细胞后加入免疫荧光二抗孵育 40 min, PBST 洗涤细胞 3 次,加入 DAPI 染色 10 min,洗 3 次加入抗荧光淬灭试剂,荧光显微镜下观察。

3.7 Hoechst 和 PI 双染检测细胞凋亡与坏死率

根据分组制备细胞样品后,弃上清液,重悬。依

次加入 1 mL 细胞染色缓冲液,5 μ L Hoechst 染色液和 5 μ L PI 染色液,混匀,4 $^{\circ}$ C 孵育 20 min。离心后,PBS 洗涤一次,在荧光显微镜下观察。

3.8 Western blot 检测 Drp1 及凋亡相关蛋白表达量

各组细胞弃上清,用预冷的 PBS 洗涤后,加入提前制备好的含有蛋白酶磷酸酶抑制剂的 RIPA 裂解液在冰上充分裂解 30 min,收集细胞,12 000 r/min 离心 20 min(离心半径 10 cm),收集上清获得蛋白,用 A280 法进行蛋白浓度测定后,按照均一浓度为 20 μ g/10 μ L 准备蛋白上样样本,随后依次完成制胶,上样,电泳,电转,封闭,加入 Drp1(1:3 000)、Bcl-2(1:2 000)、Bax(1:5 000)、cleaved Caspase-3(1:2 000)一抗后,4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,洗膜,二抗孵育,最后滴加 ECL 发光液,使用显影仪曝光拍照,应用 ImageJ 软件对得到的条带进行灰度值分析。

3.9 统计学方法

采用 GraphPad Prism 9.0 和 SPSS 20.0 软件进行数据分析和统计,结果以“ $\bar{x}\pm s$ ”表示。对于符合正态分布且具备方差齐性的数据,采取单因素方差分析法, $P<0.05$ 表示差异存在统计学意义。

4 结果

4.1 网络药理学结果

4.1.1 靶点筛选 通过 GeneCards 和 OMIM 数据库,搜索关键词“heart failure”,TCMSP 和 SwissTar-

getPrediction 数据库搜索 LFN2 成分的靶点,整理后得到 5 140 个疾病靶点,946 个药物靶点。将药物靶点和疾病靶点求交集得到交集靶点 553 个。详见图 1。

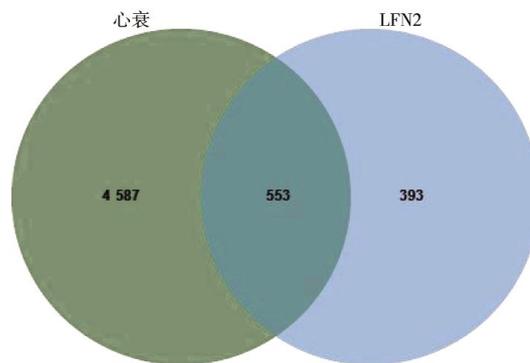


图 1 韦恩图

Fig.1 Venn diagram

4.1.2 核心靶点及药物-成分-疾病 PPI 网络构建 将上述交集靶点输入 STRING 数据库,并将交集靶点文件导入 Cytoscape3.9.1 软件对关键靶点可视化(图2)。并根据 MCC 算法得到 AKT1、ALB、TNF 排名前三的靶点,在该网络中靶点 HSD11B1、AR、PGR、PTPN1、CYP19A1 等靶点连接的边线较其他多。同时,Gin sensoside Rh4、Biatractylolide、Panaxydol、Danshenxin-kun D 和 Tumulosic acid 等成分在网络中的 Degree 值也较大,可能在复方成分干预心力衰竭的过程中发挥重要作用。

4.1.3 GO/KEGG 富集分析 GO 功能和 KEGG 通

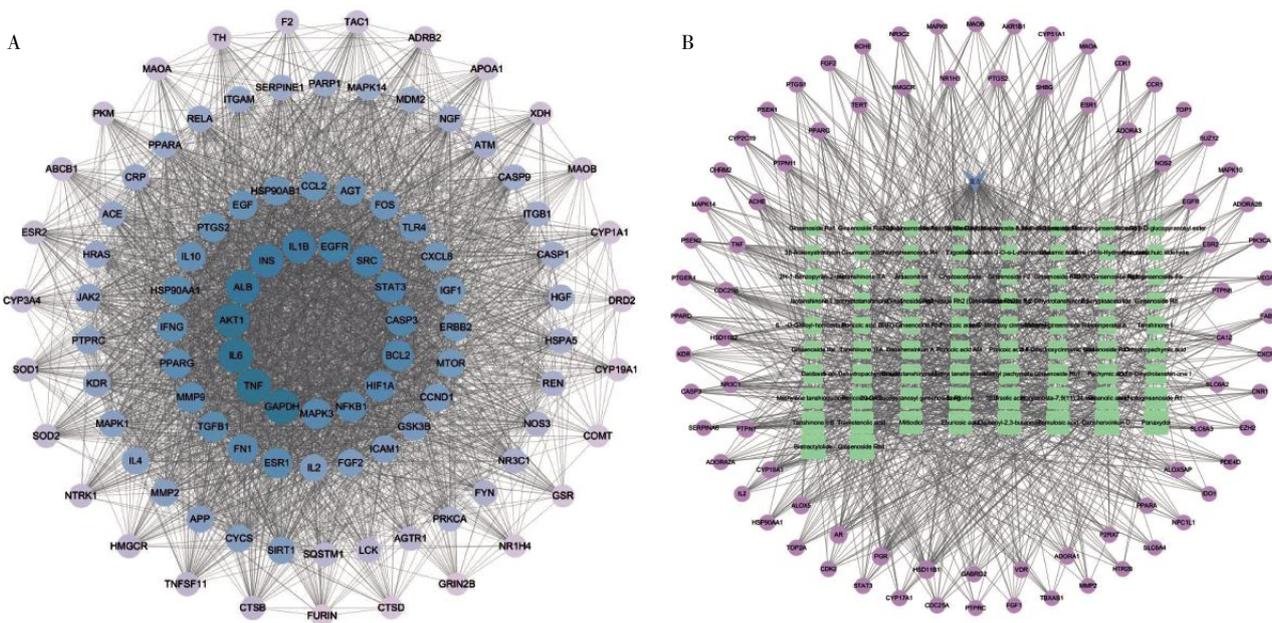


图 2 PPI 网络图

Fig.2 PPI network diagram

注:A.核心靶点 PPI 网络构建;B.药物-成分-疾病 PPI 网络构建。

路富集分析结果显示,GO 富集分析共获得 1 412个生物过程(biological process, BP)、172 个细胞组分(cellular component, CC)、363 个分子功能(molecular function, MF),依据 *P* 值大小,分别列举每个模块前 10 的条目(见图 3)。通过 KEGG 通路富集分析得到 202 条通路 (*P*<0.05)。选择前 20 条进行展示(见图 3)。GO 分析中 BP 主要涉及对异生物质的反应、蛋白质磷酸化、炎症反应、凋亡过程的负向调控等,CC 主要涉及细胞外空间、线粒体、细胞质基质、细胞质等;MF 主要涉及蛋白激酶活性、酶结合、蛋白质丝氨酸/苏氨酸激酶活性、蛋白质丝氨酸激酶活性、ATP 结合等。KEGG 通路富集分析结果显示 LFN2 调节心力衰竭作用与 Wnt 信号通路、Rap1 信号通路、MAPK 信号通路、PPAR 信号通路、cAMP 信号通路、胰高血糖素信号通路、肾素分泌、致心律失常性右室心肌病、内分泌抵抗、昼夜节律、胰岛素抵抗等疾病和代谢通路过程密切相关,提示了 LFN2 活性成分可能通过控制多种复杂生物途径,发挥对心力衰竭的治疗作用。

4.1.4 分子对接 采用 AutoDock 软件将上述“药物-成分-疾病靶点图”网络中筛选出的前 5 个核心成分 Ginsenoside Rh4、Biatractylolide、Panaxydol、Danshenxinkun D 和 Tumulosic acid 及核心靶点 GAPDH、TNF、IL-6、AKT1、ALB 进行对接验证,得到各小分子化合物与大分子蛋白结合能。通常认为结合能 <-4.184 kJ·mol⁻¹,配体和受体能自发结合,结合能

越低,亲和力越强,发生作用的可能性越大。将获得的各成分与靶点的结合能结果以表所示。详见图 4。

4.2 细胞实验结果

4.2.1 CCK-8 对 DOX 及 LFN2 作用最适浓度的筛选 本研究中 DOX 对心肌细胞的 IC₅₀ 为 0.5 μmol/L,后续选用此浓度作为 H9C2 细胞心力衰竭模型的造模浓度。而 LFN2 药物随着药物浓度的增加,细胞活力呈现先升高后降低的变化趋势,在 5 μg/mL⁻¹ 达到细胞活力的峰值,故 5 μg/mL⁻¹ 的 LFN2 作为最佳药物浓度,Db-cAMP 浓度^[7]以 100 μmol·L⁻¹ 用于后续实验,见图 5。

4.2.2 RT-qPCR 检测各组 ANP、BNP mRNA 的相对表达量的影响 与对照组相比,模型组 ANP、BNP 的 mRNA 的相对表达量显著升高 (*P*<0.01);与模型组相比,LFN2 组和 Db-cAMP 组 ANP、BNP mRNA 的相对表达量均降低 (*P*<0.05),与 LFN2 组相比,LFN2+Db-cAMP 组 ANP、BNP mRNA 进一步降低 (*P*<0.05)。详见图 6。

4.2.3 ELISA 检测各组细胞中 cAMP 含量 与对照组相比,模型组 cAMP 含量显著下降 (*P*<0.05);与模型组相比,LFN2 与 Db-cAMP 组 cAMP 含量均升高 (*P*<0.05);与 LFN2 组相比 (*P*<0.05),LFN2+Db-cAMP 组 cAMP 含量进一步上调 (*P*<0.05)。详见图 7。

4.2.4 LFN2 对各组 Drp1 荧光强度的影响 与对照组相比,模型组 Drp1 荧光强度显著升高 (*P*<0.01);与模型组相比,Db-cAMP 组及 LFN2 组 Drp1 荧光

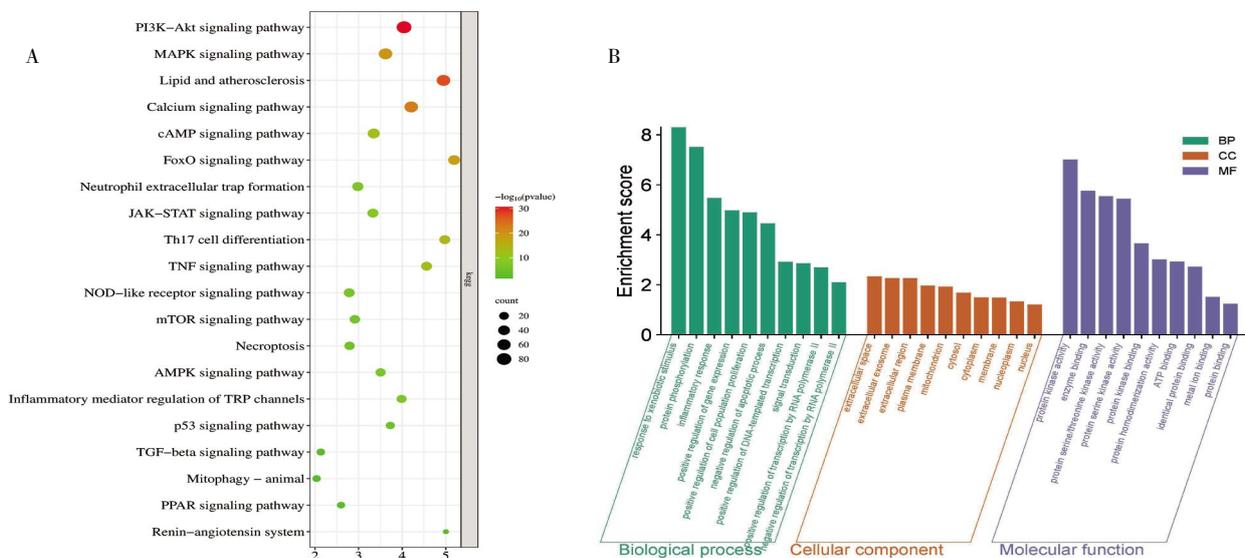


图 3 富集分析

Fig.3 Enrichment analysis

注:A.KEGG 富集分析;B.GO 富集分析。

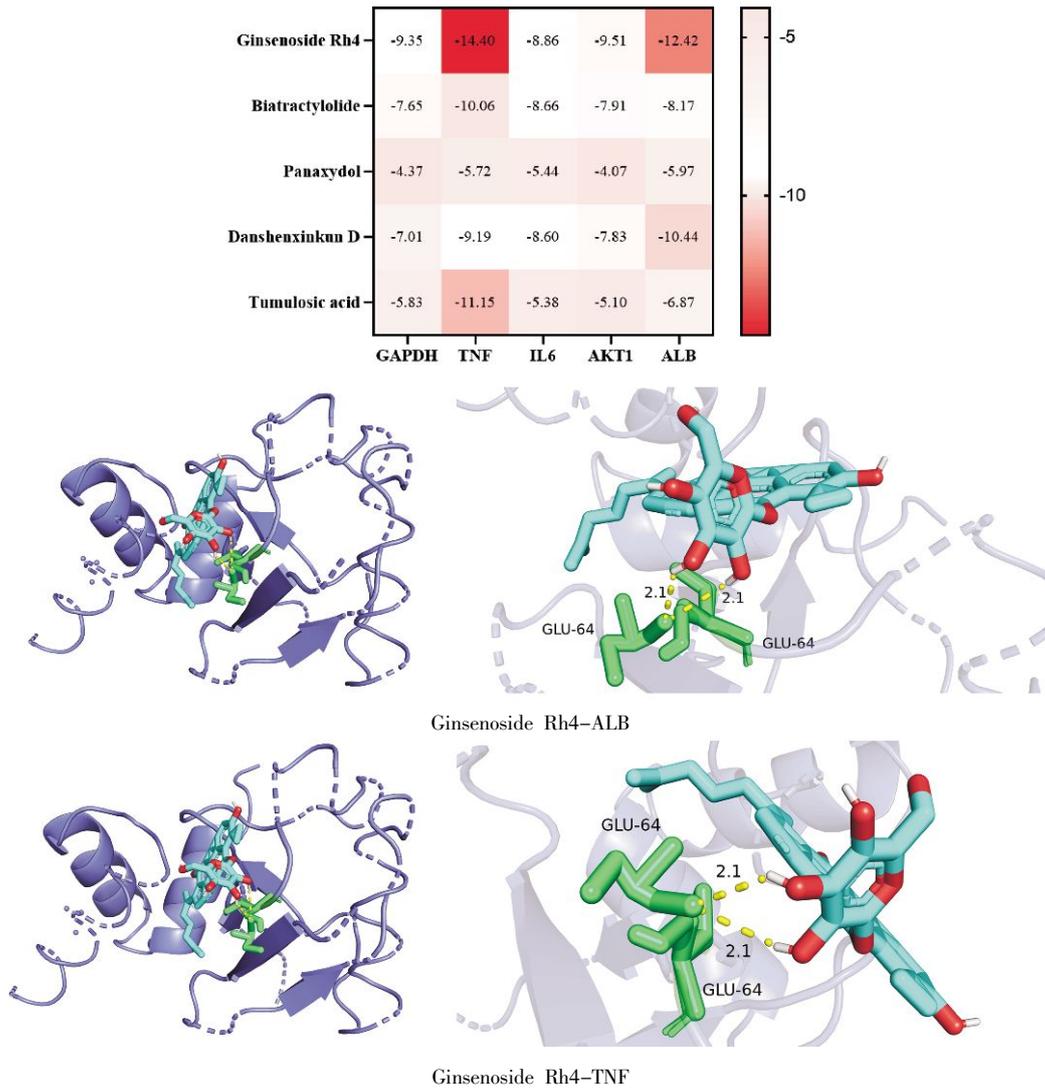


图 4 分子对接结果及能热图

Fig.4 Molecular docking results and binding energy heatmap

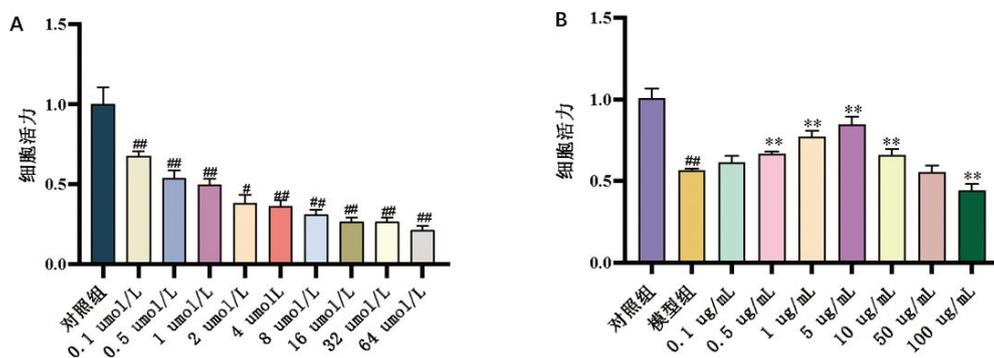


图 5 CCK-8 对 DOX 和 LFN2 浓度的筛选 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig.5 CCK-8 screening for DOX and LFN2 concentrations ($\bar{x} \pm s, n=3$)

注:与对照组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$;与模型组比较, * $P < 0.05$;与 LFN2 组比较, ^ $P < 0.05$ 。

强度均降低 ($P < 0.05$); 与 LFN2 组相比, LFN2+Db-cAMP 组 Drp1 的荧光强度进一步下降 ($P < 0.05$)。详见图 8。

4.2.5 Hoechst 和 PI 双染检测细胞凋亡与坏死率结果 Hoechst 呈现蓝光, 主要与细胞核结合, PI 呈现

红光, 与细胞晚期凋亡和坏死相关。与对照组相比, 模型组细胞 PI 荧光强度显著升高 ($P < 0.05$); 与模型组相比, Db-cAMP 组及 LFN2 组 PI 荧光强度均降低 ($P < 0.05$); 与 LFN2 组相比, LFN2+Db-cAMP 组 PI 的荧光强度进一步下降 ($P < 0.05$)。详见图 9。

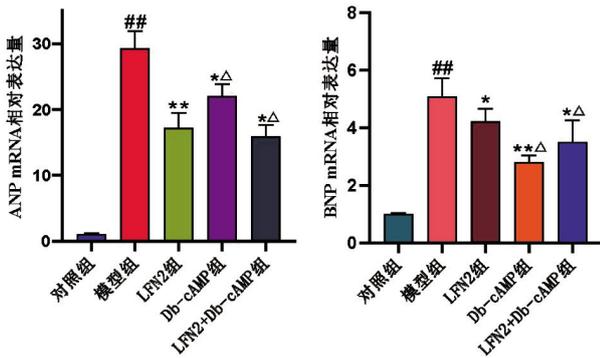


图 6 RT-qPCR 检测各组 ANP、BNP mRNA 表达量($\bar{x}\pm s, n=3$)

Fig.6 RT-qPCR measurement of ANP and BNP mRNA expression levels in each group ($\bar{x}\pm s, n=3$)

注: 与对照组比较, [#] $P<0.05$, ^{##} $P<0.01$; 与模型组比较, ^{*} $P<0.05$; 与 LFN2 组比较, ^Δ $P<0.05$ 。

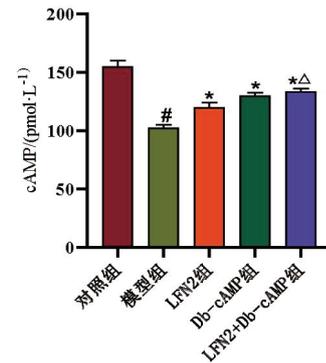


图 7 ELISA 检测各组细胞 cAMP 水平($\bar{x}\pm s, n=3$)

Fig.7 ELISA determination of cAMP level in each group of cells ($\bar{x}\pm s, n=3$)

注: 与对照组比较, [#] $P<0.05$; 与模型组比较, ^{*} $P<0.05$, 与 LFN2 组比较, ^Δ $P<0.05$ 。

4.2.6 LFN2 对 Drp1 和细胞凋亡相关蛋白表达量的影响 与对照组相比,模型组 Drp1、cleaved Caspase-3、促凋亡蛋白 Bax 升高($P<0.05$),抗凋亡蛋白 Bcl-2 下降($P<0.05$);与模型组相比,LFN2 组 Drp1、cleaved Caspase-3、促凋亡蛋白 Bax 降低($P<0.05$),抗凋亡蛋白 Bcl-2 升高($P<0.05$);与 LFN2 组相比, LFN2+Db-cAMP 组 Drp1 蛋白进一步下降($P<0.05$),抗凋亡蛋白 Bcl-2 进一步升高($P<0.05$),但 cleaved Caspase-3、促凋亡蛋白 Bax 同样升高($P<0.05$)。详见图 10。

5 讨论

心力衰竭是心系疾病中一种复杂的临床综合征,相关研究显示,心力衰竭患者 5 年死亡率约为 50%,预后与恶性肿瘤相当^[8],目前中国 35 岁及以上成年人心力衰竭患病率约为 1.3%^[9],随着人口老龄化进程加速以及冠心病、高血压等基础心血管疾病的年轻化,心力衰竭发病呈现逐年增高的趋势,成为全球性的重大公共卫生问题之一。心力衰竭病情严重程度与心功能分级、射血分数、合并症及治疗规范性密切相关^[10]。若心输出量长期不足使得肾、肝、肠等重

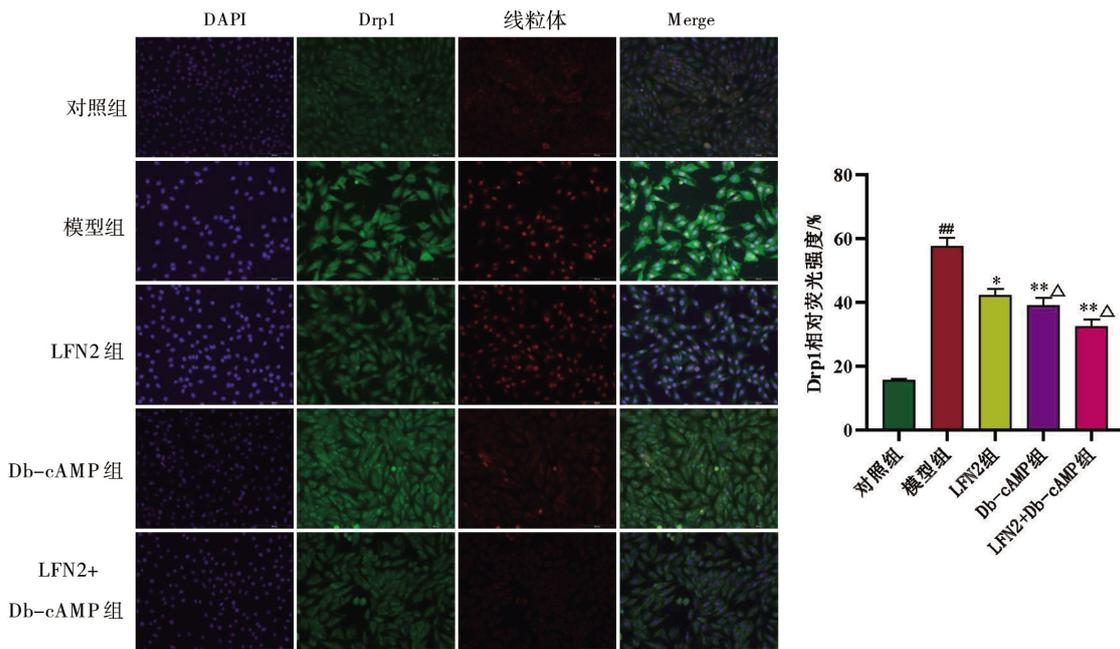


图 8 免疫荧光染色检测 H9C2 细胞中 Drp1($\bar{x}\pm s, n=3$)

Fig.8 Immunofluorescence staining quantification of Drp1 in H9C2 cells ($\bar{x}\pm s, n=3$)

注: 与对照组比较, [#] $P<0.05$, ^{##} $P<0.01$; 与模型组比较, ^{*} $P<0.05$, ^{**} $P<0.01$; 与 LFN2 组比较, ^Δ $P<0.05$ 。

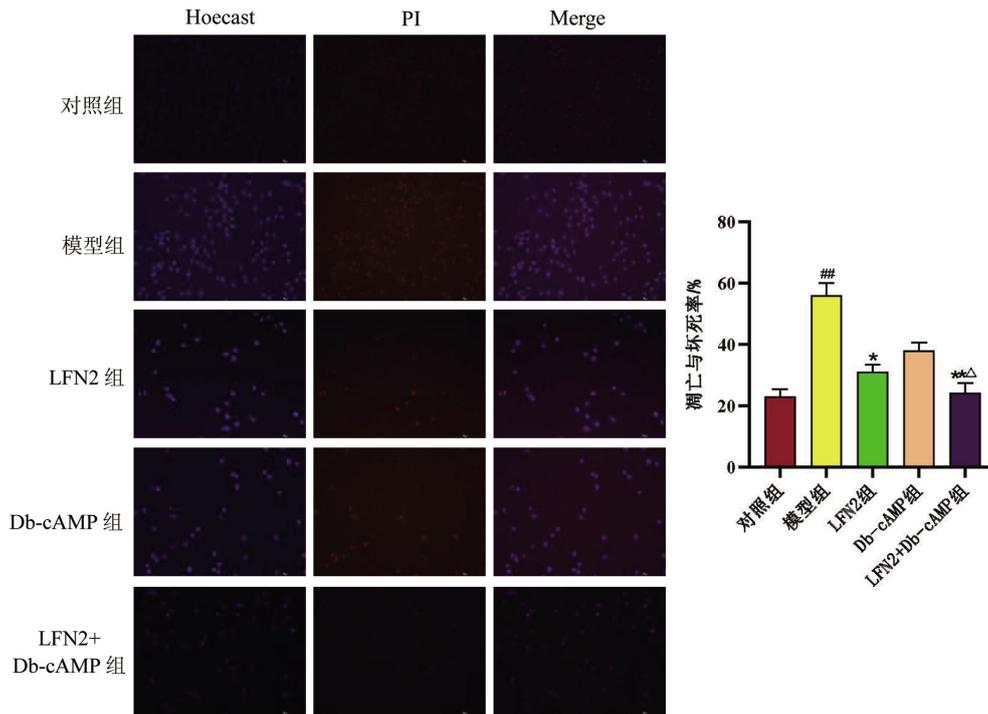


图9 Hoechst 和 PI 双染检测细胞凋亡与坏死率($\bar{x}\pm s, n=3$)

Fig.9 Quantification of apoptosis and necrosis rates by Hoechst/PI double staining ($\bar{x}\pm s, n=3$)

注:与对照组比较,[#] $P<0.05$,^{##} $P<0.01$;与模型组比较,^{*} $P<0.05$,^{**} $P<0.01$,与 LFN2 组比较,[△] $P<0.05$ 。

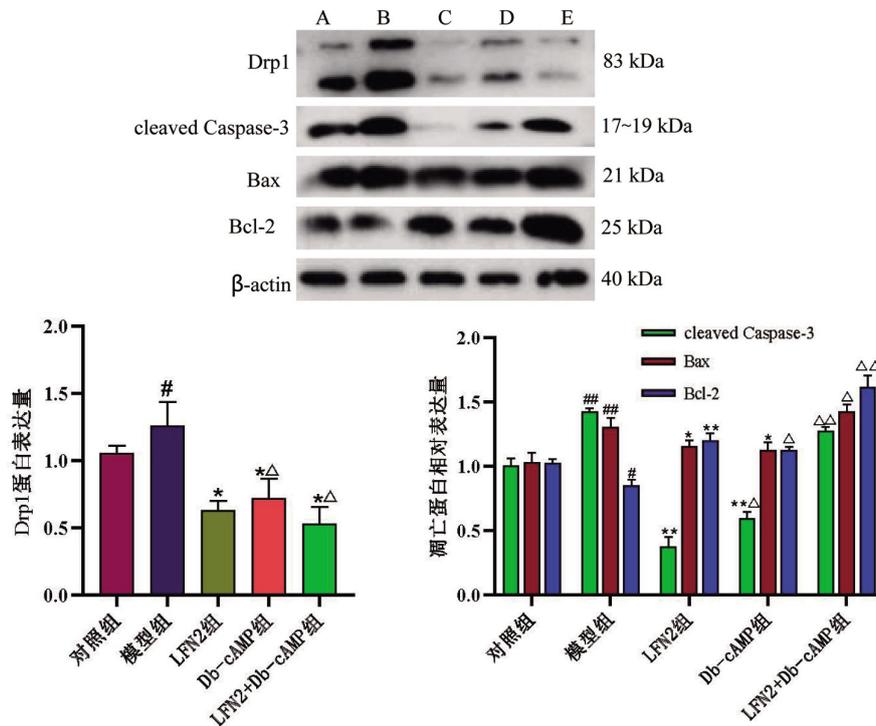


图10 WB 检测 Drp1 和凋亡蛋白相对表达量($\bar{x}\pm s, n=3$)

Fig.10 Western blot quantification of relative expression levels of Drp1 and apoptosis-related proteins ($\bar{x}\pm s, n=3$)

注:A.对照组;B.模型组;C.LFN2组;D. Db-cAMP组;E. LFN2+ Db-cAMP组。与对照组比较,[#] $P<0.05$,^{##} $P<0.01$;与模型组比较,^{*} $P<0.05$,^{**} $P<0.01$,与 LFN2 组比较,[△] $P<0.05$,^{△△} $P<0.01$ 。

要器官受累,常因多器官功能衰竭而死亡。

心力衰竭患者心输出量下降主要由心室病理性

重构引起,心室病理性重构是心肌细胞和成纤维细胞异常增殖与凋亡失衡的结果,主要受神经内分泌

的调节^[11]。作为激素、神经递质调节的第二信使cAMP,在此病理过程中发挥重要作用^[12-14]。既往研究发现,cAMP水平下降可抑制PKA活性,减少对Drp1的磷酸化修饰,促使Drp1从细胞质移位至线粒体外膜。线粒体外膜是Bcl-2抗凋亡与Bax促凋亡蛋白共同作用平台,Drp1增多可竞争性结合抗凋亡蛋白Bcl-2,削弱Bcl-2对促凋亡蛋白Bax的抑制能力,并引发细胞色素等促凋亡因子释放与cleaved Caspase-3的激活,多因素协同作用,可导致内源性细胞凋亡^[15],并可通过炎症因子级联反应最终引起全身炎症反应,加重心力衰竭病情进展。

LFN2是王显教授根据慢性心力衰竭急性发作起病急,传变迅速,易累多脏等风证特点,创新性提出治疗心力衰竭的方剂^[16],是中医学“络虚风动”理论的具体应用。络风内动理论亦认为,心力衰竭始于气虚停饮,阳气内弱,心下空虚,行血无力,痰饮血瘀等病理产物蓄积,壅滞络脉,酿生伏风,如遇外风侵袭,无力抗邪,引动内风逆乱气血则可引动心力衰竭发作。线粒体是心肌细胞能量代谢的主要场所,同时介导细胞凋亡及免疫反应,线粒体功能障碍与心力衰竭的发生发展密切相关^[17]。线粒体动力学失衡是呼吸链电子传递受阻、ATP合成锐减、免疫低下(虚气)的根源,线粒体呼吸链异常会导致mtROS大量堆积,损伤细胞膜的完整性,促使凋亡因子(络脉伏风)的释放,并引起细胞焦亡与极化、加速炎症的激活(络风内动)^[18]。课题组前期研究发现,LFN2可降低心力衰竭患者的炎症因子表达,改善能量代谢障碍并抑制ROS的释放^[19]。基于以上研究基础,我们提出假说:络虚风动过程本质是“线粒体能量耗竭-凋亡心肌细胞蓄积-炎症级联”的递进失控。

故本研究旨在运用网络药理学和细胞实验初步探索LFN2治疗心力衰竭的机制,网络药理学结果显示,LFN2治疗心力衰竭的主要活性成分包括人参皂苷Rh4、双白术内酯、人参炔醇、丹参新醌D和土莫酸,这些物质是人参、白术、丹参、茯苓的有效成分,是益气活血利水法调节线粒体功能并改善过度细胞凋亡的常用药^[20-21],而PPI网络分析发现LFN2与心力衰竭交集靶点的枢纽基因为*HSD11B1*、*AR*、*PGR*、*PTPN1*、*CYP19A1*,这些基因皆与cAMP通路直接或间接相关;值得注意的是,GO富集分析中CC和BP两个类别,线粒体细胞组分和凋亡信号通路

均显著富集。线粒体不仅是cAMP信号通路作用的下游靶点,且是调控细胞凋亡的关键细胞器^[22]。此外KEGG通路富集分析提示,LFN2可能通过调控cAMP信号通路来治疗心力衰竭。而相关研究显示线粒体动力学异常和细胞过度凋亡皆是诱导炎症激活的关键因素^[23-24],这与络虚生风的病变过程同样具有一致性。故本研究将LFN2治疗心力衰竭的通路锚定于cAMP/Drp1、细胞凋亡通路。

多个研究采用不同造模方式制备的心力衰竭模型中,如丁霞^[25]通过对多柔星诱导的慢性心力衰竭大鼠的研究发现木防己汤可通过cAMP/PKA/AQP2信号通路改善心力衰竭大鼠的心功能,梁涛等^[26]采用盐酸普鲁帕酮注射液制备的心力衰竭模型,发现cAMP/PKA信号转导通路对心肌细胞收缩有重要影响。王萧等^[27]利用全基因表达谱芯片分析导管术造成心气虚型心力衰竭模型家兔的差异表达基因提示,心力衰竭程度与cAMP含量成反比。本研究通过DOX诱导H9C2复制心力衰竭模型,通过检测细胞中的ANP和BNP的mRNA表达确保心力衰竭模型制备成功,与模型组相比,LFN2可降低ANP和BNP的mRNA,证实LFN2可发挥治疗心力衰竭的作用。为进一步探索LFN2治疗心力衰竭的机制,采用Elisa和WB等多种方法检测cAMP/Drp1及细胞凋亡相关蛋白Bax、Bcl-2、cleaved Caspase-3。结果表明:与对照组相比,模型组cAMP表达减少,Drp1蛋白及荧光强度增加,促凋亡蛋白Bax、cleaved Caspase-3升高,抗凋亡蛋白Bcl-2下降;相较于模型组,Db-cAMP组及LFN2组Drp1蛋白及荧光强度下降,促凋亡蛋白Bax和cleaved Caspase-3降低,抗凋亡蛋白Bcl-2升高,与LFN2组相比,LFN2+Db-cAMP组Drp1免疫荧光和蛋白表达进一步降低,抗凋亡蛋白Bcl-2进一步升高,促凋亡蛋白Bax和cleaved Caspase-3虽亦升高,但Bcl-2/Bax比值升高。上述实验结果初步表明LFN2可能通过上调cAMP,抑制Drp1和抗细胞凋亡从而改善心力衰竭的病情。

综上,LFN2可改善心力衰竭的病情严重程度,这可能归因于其调控cAMP/Drp1通路及抗凋亡通路。该研究为中医药在心力衰竭治疗中提供了新思路,并初步挖掘了从风论治心力衰竭的科学内涵。

参考文献

- [1] 中华医学会心血管病学分会 中国医师协会心血管内科医师分会, 中国医师协会心力衰竭专业委员会, 等. 中国心力衰竭诊断和治疗指南 2024[J]. 中华心血管病杂志, 2024, 52(3): 235-275.
- [2] 陈游洲, 袁建松, 乔树宾. 心力衰竭中能量代谢重构研究进展[J]. 中国循环杂志, 2014, 29(4): 306-308.
- [3] 廖玉华, 廖梦阳. 心力衰竭新机制: 免疫代谢炎症[J]. 临床心血管病杂志, 2025, 41(1): 4-8.
- [4] 李红梅, 王 显. 基于络风内动病机理论的络风宁系列方剂研究进展[J]. 中国循证心血管医学杂志, 2016, 8(9): 1132-1136.
- [5] 王 显, 胡大一. 急性冠脉综合征“络风内动”假说临床研究[J]. 中华中医药杂志, 2008, 23(3): 204-208.
- [6] 王子怡, 王 鑫, 张岱岩, 等. 中医药网络药理学: 《指南》引领下的新时代发展[J]. 中国中药杂志, 2022, 47(1): 7-17.
- [7] 李晓华. 二丁酰环磷腺苷和氨茶碱对 PC12 细胞缺氧葡萄糖剥夺的作用初探[D]. 广州: 南方医科大学, 2010.
- [8] WANG H, LI Y Y, CHAI K, et al. Mortality in patients admitted to hospital with heart failure in China: A nationwide Cardiovascular Association Database-Heart Failure Centre Registry cohort study[J]. The Lancet Global Health, 2024, 12(4): e611-e622.
- [9] HAO G, WANG X, CHEN Z, et al. Prevalence of heart failure and left ventricular dysfunction in China: The China Hypertension Survey, 2012-2015[J]. European Journal of Heart Failure, 2019, 21(11): 1329-1337.
- [10] 国家心血管病中心, 中国心血管健康与疾病报告编写组, 胡盛寿. 中国心血管健康与疾病报告 2024 概要 [J]. 中国循环杂志, 2025, 40(6): 521-559.
- [11] 石雷雷, 尹德春, 杨双双, 等. 神经内分泌失衡与心力衰竭[J]. 心血管病学进展, 2019, 40(4): 547-550.
- [12] ZHANG A L, LIU Y Y, PAN J N, et al. Delivery of mitochondria confers cardioprotection through mitochondria replenishment and metabolic compliance[J]. Molecular Therapy, 2023, 31(5): 1468-1479.
- [13] PAGANO ZOTTOLA A C, MARTIN-JIMENEZ R, LAVANCO G, et al. Potentiation of mitochondrial function by mitDREADD-G reverses pharmacological and neurodegenerative cognitive impairment in mice[J]. Nature Neuroscience, 2025, 28(9): 1844-1857.
- [14] 刘光伟, 龚守良. 细胞凋亡的线粒体调控机制与电离辐射[J]. 国外医学(放射医学核医学分册), 2003, 27(2): 90-93.
- [15] 贾振伟. cAMP 信号与动物细胞线粒体功能[J]. 中国细胞生物学学报, 2016, 38(10): 1260-1268.
- [16] 郑清华, 郑相颖, 邱 璐, 等. 从“络风内动”探讨急性心力衰竭中活性氧与络风的相关性[J]. 中医学报, 2025, 40(4): 747-752.
- [17] 孙 侠, 赵倩茹, 袁 伟. 心肌线粒体能量代谢在心血管疾病中的研究进展[J]. 中国心血管杂志, 2022, 27(1): 90-93.
- [18] 王保福, 王达洋, 李海燕, 等. 从一氧化氮试论“络风内动”理论的现代医学内涵[J]. 中华中医药杂志, 2022, 37(9): 5299-5303.
- [19] 李海燕. 络风宁 2 号方抑制心肌细胞铁死亡对心力衰竭的药效和机制研究[D]. 北京: 北京中医药大学, 2022.
- [20] 强祎彤, 黑炫鼎, 禹笑阳, 等. 抗纤益心方调控 IP3R-GRP75-VDAC1 钙调节轴抑制 H9c2 心肌细胞凋亡的作用机制[J]. 中医学报, 2025, 40(8): 1757-1763.
- [21] YANG Y, LIN C T, WANG Y, et al. Danqi soft caspule alleviates myocardial ischemia-reperfusion injury induced cardiomyocyte apoptosis by attenuating mitochondrial fission[J]. Frontiers in Pharmacology, 2025, 16: 1526253.
- [22] ZHANG Y S, KNIGHT W, CHEN S, et al. Multiprotein complex with TRPC (transient receptor potential-canonical) channel, PDE1C (phosphodiesterase 1C), and A2R (adenosine A2 receptor) plays a critical role in regulating cardiomyocyte cAMP and survival[J]. Circulation, 2018, 138(18): 1988-2002.
- [23] GETO Z, MOLLA M D, CHALLA F, et al. Mitochondrial dynamic dysfunction as a main triggering factor for inflammation associated chronic non-communicable diseases[J]. Journal of Inflammation Research, 2020, 13: 97-107.
- [24] DUAN Y H, LI Q Y, WU J J, et al. A detrimental role of endothelial S1PR2 in cardiac ischemia-reperfusion injury via modulating mitochondrial dysfunction, NLRP3 inflammasome activation, and pyroptosis[J]. Redox Biology, 2024, 75: 103244.
- [25] 丁 霞. 基于 AVP/cAMP/PKA/AQP2 信号通路研究木防己汤治疗慢性心力衰竭的作用机制[D]. 南昌: 江西中医药大学, 2024.
- [26] 梁 涛, 耿 姗, 周玲玲, 等. 附子及附子干姜配伍对心衰大鼠血流动力学和 cAMP-PKA 信号转导通路的影响[J]. 中国老年学杂志, 2015, 35(19): 5392-5394.
- [27] 王 萧, 许庆文, 董浩然, 等. 基于 cAMP、cGMP 及基因表达谱改变对心气虚型家兔模型初探[C]//第十届中国实验动物科学年会论文集. 扬州, 2012: 84-90.

(本文编辑 苏 维)