

基于网络药理学的双丹方治疗冠心病的作用机制研究

李昊楠¹, 孔浩天¹, 史永平^{1,2}, 李晓彬¹, 张姗姗¹, 张轩铭¹, 张云¹, 田青平², 韩利文^{1*}, 刘可春^{1*}

1. 齐鲁工业大学(山东省科学院) 山东省科学院生物研究所, 山东省人类疾病斑马鱼模型与药物筛选工程技术研究中心, 山东 济南 250103

2. 山西医科大学药学院, 山西 太原 030001

摘要: **目的** 利用网络药理学的方法探索双丹方治疗冠心病(CHD)的活性成分和分子作用机制。**方法** 采取类药五原则筛选双丹方活性成分;经TCMSP数据库获得双丹方活性成分的靶蛋白,并在OMIN数据库查找CHD的靶点蛋白;运用Cytoscape软件构建双丹方活性成分-潜在靶点、双丹方活性成分-CHD疾病靶点的相互作用网络,通过度等网络拓扑特征评价筛选出双丹方在CHD作用的核心靶点;通过STRING数据库进行蛋白质相互作用分析;采用斑马鱼模型研究双丹颗粒的促进血管生成作用。**结果** 从TCMSP数据库得到双丹方中丹参酮、丹皮酚等39个活性成分和205个蛋白质靶点,筛选出与双丹方作用CHD的IL6、MAPK1、TP53、AKT1、VEGFA等核心靶点111个,GO分析共包含RNA调节、炎症反应、G蛋白偶联、类固醇激素受体活性、细胞分化、血管收缩等19条富集结果。利用DAVID数据库对相关通路富集,筛选出对冠心病具有作用的VEGF信号通路、FXO信号通路、ErBb信号通路等13条通路。**结论** 通过网络药理学验证了双丹方多成分、多靶点、整体调节的作用特点,预测了双丹方在CHD中的主要作用机制。

关键词: 双丹方;网络药理学;冠心病;丹皮;丹参;作用机制

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2019)20-4985-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.20.021

Mechanism of Shuangdan Recipe on treatment of coronary heart disease based on network pharmacology

LI Hao-nan¹, KONG Hao-tian¹, SHI Yong-ping^{1,2}, LI Xiao-bin¹, ZHANG Shan-shan¹, ZHANG Xuan-ming¹, ZHANG Yun¹, TIAN Qing-ping², HAN Li-wen¹, LIU Ke-chun¹

1. Engineering Research Center of Zebrafish Models for Human Diseases and Drug Screening of Shandong Province, Biology Institute, Qilu University of Technology (Shandong Academy of Sciences), Jinan 250103, China

2. School of Pharmacy, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China

Abstract: Objective To explore the active components and molecular mechanism of Shuangdan Recipe in the treatment of coronary heart disease by using network pharmacology. **Methods** The active ingredients of Shuangdan Recipe were screened by the five principles of generic drugs. The target protein of Shuangdan Recipe active ingredient was obtained by TCMSP database and the target protein of coronary heart disease was found in OMIN database. The interaction network of active component-potential target and active ingredient-coronary heart disease target of Shuangdan Recipe was constructed by using Cytoscape software. The core target of the effect of Shuangdan Recipe on coronary heart disease was screened by network topological characteristics such as degree, median degree, and near center degree; The STRING database protein interaction analysis was performed; The zebrafish model was used to study the pro-angiogenesis effect of Shuangdan Granules. **Results** From the TCMSP database, 39 active components such as tanshinone and paeonol and 205 protein targets were obtained from Shuangdan Recipe. A total of 111 core target genes such as IL6, MAPK1, TP53, AKT1, and VEGFA in the treatment of coronary heart disease were screened out. GO analysis results showed there were 19 bioactivity enrichments including RNA regulation, inflammatory response, G protein coupling, steroid hormone receptor

收稿日期: 2019-03-25

基金项目: 国家重点研发计划(2018YFC1707301); 山东省农业科技园区产业提升工程项目(2017YQ001); 山东省科学院地产学研协同创新基金(2017CXY-10)

作者简介: 李昊楠(1995—),男,研究生,研究方向为生物制药。Tel: 17862958363 E-mail: 17862958363@163.com

*通信作者 韩利文(1980—),男,博士,副研究员,从事斑马鱼药物筛选及中药质量研究。Tel: (0531)82605331 E-mail: hanliwen08@126.com
刘可春(1964—),男,博士,研究员,主要从事药物筛选工作。Tel: (0531)82605362 E-mail: liukechun2000@163.com

activity, cell differentiation, and vasoconstriction. The DAVID database was used to enrich the relevant pathways, and the first 13 pathways including VEGF signaling pathway, FXO signaling pathway and ErbB signaling pathway were screened for coronary heart disease. **Conclusion** The characteristics of multi-component, multi-target and overall regulation of Shuangdan Recipe were verified by network pharmacology. The main mechanism of Shuangdan Recipe in coronary heart disease was predicted, which provided theoretical basis for its active ingredient research and clinical application.

Key words: Shuangdan Recipe; network pharmacology; coronary heart disease; *Cortex Moutan*; *Salviae Radix*; mechanism of action

冠心病 (CHD) 亦称缺血性心脏病或冠状动脉心脏病, 是指因冠状动脉狭窄、供血不足而引起的心肌机能障碍和 (或) 器质性病变, 现代医学研究表明其主要病因是冠状动脉病变, 包括冠状动脉粥样硬化和冠状动脉痉挛, 其中绝大多数是由冠状动脉粥样硬化所致^[1]。CHD 发病机制是一个复杂的漫长过程, 现代医学认为主要由心血管内皮细胞损伤、平滑肌细胞增生、血小板黏附、脂代谢异常等多个发病环节组成, 其主要病理学基础为动脉粥样硬化和血脂代谢异常。利用传统中药干预 CHD 的发生、发展也是我国“健康中国”慢病防治体系中的重要内容。

双丹方由丹参、牡丹皮组成, 为活血化瘀的经典名方之一, 其系列制剂如双丹颗粒、双丹片、双丹口服液、双丹胶囊等长期应用于 CHD 的临床实践, 取得了良好的疗效。然而, 相对于广泛开展临床研究, 双丹方的基础研究则相对滞后。双丹方由丹参和牡丹皮 2 味中药组成, 丹参中脂溶性成分主要有丹参酮 I、丹参酮 II_A、丹参酮 II_B、隐丹参酮等, 水溶性成分主要有丹参素、原儿茶醛及丹酚酸 A、B、C 等^[2]。牡丹皮的化学成分有丹皮酚及酚苷类、单萜及苷类化合物、三萜类等。虽然对于 2 味药材已有一定的研究基础, 但是双丹方整体药效物质基础及作用机制尚未完全阐明, 限制了其临床的广泛应用。

中药具有多成分、多靶点、多途径的复杂作用特征, 成分间、靶点间、环节间客观存在着密切联系、相互协调与制约的复杂网络。中药复杂作用的科学阐释一直是中医药科学发展的共性问题 and 难点。网络药理学作为中药研究的学科前沿^[3-5], 融合了系统生物学和多向药理学的思想, 从整体的角度探索药物与疾病的关联性, 强调从药物、靶点与疾病间相互作用的整体性和系统性出发, 反映及阐释中药的多成分、多靶点作用关系, 其研究策略的整体性、系统性特点与中医学从整体观念、辨证论治的角度去诊治疾病的理论不谋而合^[6]。本研究采用网络药理学方法, 对双丹方多成分、多靶点与 CHD

的复杂网状关系进行研究, 为揭示双丹方作用机制的科学内涵提供参考。

1 材料

1.1 药物

双丹颗粒 (山东孔圣堂制药有限公司, 批号 18030926); 丹红注射液 (10 mL/支, 山东丹红制药有限公司, 批号 18011029); PTK787 (血管内皮细胞生长因子受体抑制剂, 购自 Abcam 公司, 质量分数 >98%, 批号 L1617021)。

1.2 动物

血管特异标记荧光转基因型斑马鱼 TG (flk1:EGFP), 由山东省科学院药物筛选技术重点实验室提供。

1.3 仪器

斑马鱼养殖系统 (北京爱生公司); AXIO Zoom.V16 蔡司体式显微镜 (卡尔蔡司公司); SPX-280B-G 型博讯光照培养箱 (上海基星生物科技有限公司); LE204E 电子天平 (梅特勒-托利多仪器公司)。

2 方法

2.1 双丹方化学成分的收集和活性成分的筛选

采用中药系统药理学分析平台 (TCMSP, <http://lsp.nwsuaf.edu.cn/tcmsp.php>), 以丹参和牡丹皮为关键词, 检索双丹方中 2 味中药的全部化学成分。双丹颗粒为口服制剂, 在人体必然经过吸收、分布、代谢、排泄 (ADME) 过程才能与靶器官、靶组织结合发挥药效。因此先采用 PaDEL-Descriptor 软件根据里宾斯基 (Lipinski) 的类药五原则对小分子化合物的类药性进行筛选: ①相对分子质量 ≤ 500; ②氢键供体 ≤ 5; ③氢键受体 ≤ 10; ④脂水分配系数 (lgP) ≤ 5; ⑤可旋转键的数量 ≤ 10。进而利用 TCMSP 数据平台, 对双丹方筛选出的成分的类药性 (DL)、血脑屏障 (BBB) 进行评估, 选取同时满足 DL ≥ 0.18、-0.3 ≤ BBB ≤ 0.3 的化学成分作为双丹方的候选活性成分。

2.2 双丹方的潜在靶点预测

将筛选好的候选活性成分在 TCMSP 数据库

(<http://lsp.nwsuaf.edu.cn/tcmsp.php>) 和 SwissTarget Prediction 数据库 (<http://swisstargetprediction.ch/>) 收集蛋白靶点, 并进一步采用 Uniprot 数据库进行转化操作, 获取与活性成分作用的相关蛋白靶点(人源)。

2.3 CHD 疾病靶点的收集

通过 OMIM 数据库 (<http://omim.org/>)、DISGENET 数据库 (<http://www.disgenet.org/>), 收集与 CHD 相关的疾病靶点。

2.4 双丹方活性成分-潜在靶点网络和双丹方活性成分-CHD 疾病靶点网络构建和分析

通过 TCMSP 数据库寻找与双丹方候选活性成分相关的潜在靶点, 将候选活性成分与其潜在的靶点蛋白上传至 Cytoscape 3.6.1 软件 (<http://www.cytoscape.org/>) 生成双丹方活性成分-潜在靶点相互作用的网络图, 并进一步对双丹方潜在靶点和 CHD 疾病靶点进行比对, 生成双丹方活性成分-CHD 疾病靶点相互作用的网络图, 并使用软件 Cytoscape 的插件 Netweek analysis 对网络特征进行分析, 以探究双丹方的药理学作用机制。

2.5 蛋白质-蛋白质相互作用 (PPI) 网络构建

为了说明靶点蛋白在系统水平上的作用, 在 STRING 数据库 (<http://string-db.org/>), 获取蛋白质相互作用信息, 并在 Cytoscape 软件上构建双丹方活性成分靶点 PPI 进行拓扑分析。

2.6 GO 功能富集分析

为说明双丹方的药靶蛋白在基因功能中的作用, 本研究通过 DAVID 数据库 (<https://david.ncifcrf.gov/>) 对 PPI 网络中筛选出的核心靶点进行 GO 功能分析。

2.7 KEGG 通路富集分析

通过 DAVID 数据库对 PPI 网络中的蛋白进行 KEGG 通路富集分析, 并使用 Omicshare 在线分析平台对富集分析结果进行可视化, 解析双丹方中抗 CHD 活性成分显著影响的生物通路, 探讨双丹方发挥治疗 CHD 作用的可能机制。

2.8 斑马鱼药效验证实验

取健康受精 24 h (hours post fertilization, hpf) 的 flk1 斑马鱼胚胎, 移入 24 孔培养板中。根据预试验结果, 设置对照组、模型组 (PTK787, 1 $\mu\text{g/mL}$)、双丹颗粒组 (终质量浓度为 2、5、10 $\mu\text{g/mL}$ 的双丹颗粒溶液与终质量浓度为 1 $\mu\text{g/mL}$ PTK787 共处理)、阳性对照组 (终体积分数 20 $\mu\text{L/mL}$ 丹红注射

液), 每组 1 孔, 每孔 10 条。将培养板放入 28.5 $^{\circ}\text{C}$ 光照培养箱中孵育 24 h。处理后通过蔡司显微镜进行斑马鱼的荧光观察、并采集每组每条斑马鱼的节间血管图片, 然后使用 Image-pro 测量每条斑马鱼的节间血管长度。结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间差异采用 SPSS 18.0 软件进行单因素方差分析。

3 结果

3.1 双丹方的活性成分

通过 TCMSP 数据库收集到丹参的化合物共 202 个, 牡丹皮的化合物共 55 个。以类药五原则和 $\text{DL} \geq 0.18$ 、 $-0.3 \leq \text{BBB} \leq 0.3$ 为筛选条件, 经过过去重后, 剩下 39 个化合物为候选化合物 (表 1)。

3.2 双丹方活性成分-潜在靶点网络

将双丹方活性成分-靶点相互作用采用 Cytoscape 构建网络, 在 39 个化合物的蛋白靶点中, 经过去重后, 共收集到双丹方潜在靶点 205 个。双丹方活性成分-靶点网络共包括 247 个节点和 572 个边 (图 1)。在网络中, 一个节点的度 (degree) 代表网络中和节点相连路线的条数。根据拓扑分析, 每个化合物的平均靶点为 14.67 个, 每个靶点平均与 2.75 个化合物相互作用。在化合物方面, 有 9 个活性成分的作用靶点大于 20, 分别是槲皮素 (MOL000098)、山柰酚 (MOL000422)、异丹参酮 (MOL007112)、氧代异隐丹参酮 (MOL0070401)、丹参新酮 D (MOL007093)、丹参酸甲酯 (MOL007117)、丹参新酮 (MOL007119)、新隐丹参酮 II (MOL007124)、新隐丹参酮 (MOL007125)。在潜在靶点中, 有 35 个靶点与 5 个及以上化合物分子连接, 说明大多数蛋白质都与其他蛋白享有共同的配体。

3.3 双丹方活性成分-CHD 疾病靶点网络

本研究在成分-靶点的基础上, 利用收集到的 137 个 CHD 疾病靶点和双丹方的潜在靶点对照, 利用 Cytoscape 软件构建双丹方活性成分-CHD 疾病靶点网络 (图 2)。包括 157 个节点 (39 个双丹方活性成分、118 个 CHD 靶点) 和 331 条边, 黄色和红色代表双丹方的成分, 蓝色代表 CHD 靶点蛋白。

3.4 双丹方疾病靶点 PPI 网络

为了进一步探讨双丹方治疗 CHD 作用机制, 本研究基于 PPI 关系, 将双丹方与 CHD 相关的 118 个靶点导入 STRING 数据库 (<http://string-db.org/>), 获取蛋白质相互作用信息, 并在 Cytoscape 软件上构建双丹方与 CHD 相关的靶点 PPI 网络 (图 3)。

表 1 双丹方活性成分信息

Table 1 Information of active ingredients from Shuangdan Recipe

TCMSP 编号	化合物名称	BBB	DL	归属药材
MOL006452	1,5-dihydroxy-3-methylanthraquinone	0.10	0.21	丹参
MOL007040	1-氧代异隐丹参酮 (1-ketoisocryptotanshinone)	-0.01	0.44	丹参
MOL007045	3 α -羟基丹参酮 II _A (3 α -hydroxytanshinone II _A)	0.22	0.44	丹参
MOL007046	3 β -羟基丹参酮 II _A (3 β -Hydroxytanshinone II _A)	-0.13	0.45	丹参
MOL007053	7-oxoroyleanone2	0.04	0.34	丹参
MOL007054	(4bS,8aS,10S)-10-hydroxy-2-isopropyl-4b,8,8-trimethyl-5,6,7,8a,9,10-hexahydrophenanthrene-3,4-dione	-0.06	0.31	丹参
MOL007058	丹参醛 (formyltanshinone)	-0.28	0.42	丹参
MOL007064	紫丹参萜醚 B (przewalskin B)	0.22	0.44	丹参
MOL007069	紫丹参甲素 (przewaquinone C)	-0.30	0.40	丹参
MOL007079	拟丹参醛 (tanshinaldehyde)	-0.07	0.45	丹参
MOL007081	丹酚醇 B (danshenol B)	0.11	0.56	丹参
MOL007082	丹酚醇 A (danshenol A)	-0.01	0.52	丹参
MOL007091	丹参新醌 B (dan-shexinkum B)	0.18	0.26	丹参
MOL007092	丹参新醌 C (dan-shexinkum C)	0.03	0.21	丹参
MOL007093	丹参新醌 D (dan-shexinkum D)	-0.15	0.55	丹参
MOL007112	异丹参酮 I (isotanshinone I)	0.19	0.36	丹参
MOL007117	丹参酸甲酯 (methyltanshinonate)	0.09	0.55	丹参
MOL007119	丹参酚醌 I (miltionone I)	-0.11	0.32	丹参
MOL007120	丹参酚醌 II (Imiltionone II)	0.03	0.44	丹参
MOL007121	丹参环庚三烯酚酮 (miltipolone)	0.17	0.37	丹参
MOL007123	丹参新酮 II (miltirone II)	-0.25	0.24	丹参
MOL007125	新隐丹参酮 (neocryptotanshinone)	-0.13	0.32	丹参
MOL007124	新隐丹参酮 II (neocryptotanshinone II)	0.16	0.23	丹参
MOL007128	paramiltioic acid	-0.29	0.37	丹参
MOL007158	(3 β , 5 α , 25S)-spirostan-3-ol	0.25	0.81	丹参
MOL007069	丹参酮 VI (tanshinone VI)	-0.28	0.30	丹参
MOL007384	paeonidanin_qt	-0.59	0.35	牡丹皮
MOL007382	牡丹皮苷 H (mudanpioside-h_qt 2)	-0.96	0.37	牡丹皮
MOL007377	mudanoside A	-1.67	0.29	牡丹皮
MOL007374	5-[[5-(4-甲氧基苯基)-2-呋喃基]亚甲基]巴比妥酸 (5-[[5-(4-methoxyphenyl)-2-furyl]methylene]barbituric acid)	-0.70	0.30	牡丹皮
MOL007371	6-O-vanillyoxypaeoniflorin_qt 2	-1.19	0.37	牡丹皮
MOL007369	4-O-methylpaeoniflorin	-0.15	0.43	牡丹皮
MOL007367	牡丹酚苷 (paeonoside)	-1.04	0.24	牡丹皮
MOL007366	galloyl-oxypaeoniflorin_qt 2	-0.97	0.44	牡丹皮
MOL005090	oxypaeoniflorin_qt	-1.28	0.44	牡丹皮
MOL001925	芍药苷 (paeoniflorin_qt)	-0.73	0.40	牡丹皮
MOL000492	(+)-儿茶素 [(+)-catechin]	-0.73	0.24	牡丹皮
MOL000422	山柰酚 (kaempferol)	-0.55	0.24	牡丹皮
MOL000098	槲皮苷 (quercetin)	-0.77	0.28	牡丹皮

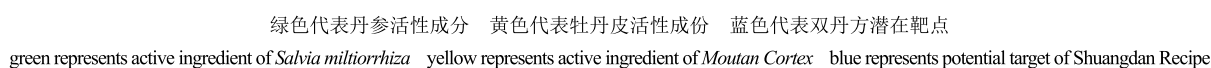


Fig. 1 Active ingredient-potential target network diagram of Shuangdan Recipe

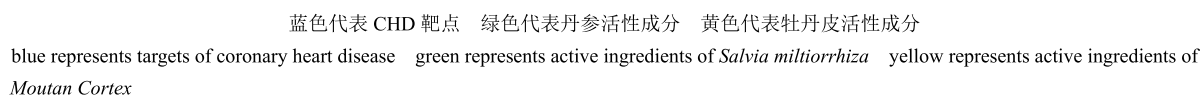


Fig. 2 Network map of active ingredient-coronary heart disease target of Shuangdan Recipe

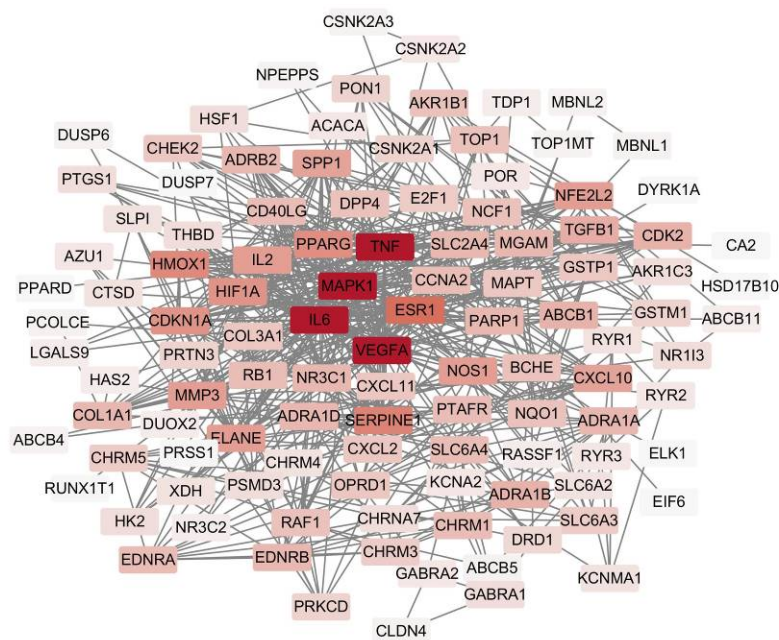


图 3 双丹方疾病靶点 PPI 网络

Fig. 3 Disease-target PPI network of Shuangdan Recipe

双丹方疾病靶点 PPI 网络中包含 111 个节点和 544 条相互作用关系。节点颜色的深浅代表该节点的度值的大小，颜色越深代表度值越大。利用 Cytoscape 软件对双丹方 PPI 网络拓扑学特征进行分析，发现其中度值大于均值 (9.8) 的节点有 51 个，占总节点数的 45.9%。关键节点包括 MAPK1、TP53、AKT1、VEGFA、MAPK8、IL6 等靶蛋白，其中度值最高的为 IL6，能与 47 个蛋白发生相互作用。

3.5 GO 功能富集分析

利用 DAVID 数据库对双丹方疾病靶点 PPI 网络中涉及的 111 个 (经过 STRING 数据库筛选) 双丹方核心靶点进行 GO 功能富集分析,共收集到 103 条。根据错误发现率 (FDR) < 0.5, 有 19 条符合条件,其中包括生物过程、分子功能、细胞组成,并列出了 GO 条目 (表 2)。主要涉及 RNA 调节、炎症反应、G 蛋白偶联、类固醇激素受体活性、细胞分化、血管收缩等方面功能。

3.6 KEGG 通路富集分析

利用 DAVID 数据库对筛选出的核心靶点进行 KEGG 通路富集分析,将双丹方疾病靶点 PPI 靶点网络中得到的 111 个蛋白靶点进行 KEGG 通路富集分析,仅检索到 90 个靶点,11 个靶点未检索到,得到 81 条信号通路,以 $P < 0.2$ 进行筛选,得到前 13 的信号通路。通过 Omicshare 在线平台对 P 值前

13 的通路进行可视化处理。如图 4 所示,本研究通过 rich factor, P 值富集到通路上的基因个数来衡量 KEGG 富集程度。其中 rich factor 表示差异表达的基因中位于该通路的条目的基因数目与所有注释基因中位于该通路的目的基因总数的比值。rich factor 越大代表富集程度越高。

3.7 斑马鱼实验结果

实验结果可知,2、5、10 $\mu\text{g/mL}$ 的双丹颗粒对 flk1 斑马鱼的节间血管的生长都具有明显的促进作用,与模型组比较,差异显著,结果见图 5 和 6。

4 讨论

本研究利用网络药理学方法分析了双丹方的有效成分,构建双丹方活性成分-潜在靶点网络,分析了双丹方活性成分与靶点之间的相互关系。其中双丹方活性成分-潜在靶点网络中的关键成分是丹参素、丹参酮 II_A、丹皮酚等。根据研究表明,丹参素主要是通过促进舒血管因子的释放、钾通道的部分开放和抑制钙通道发挥舒张血管的作用,从而改善高血压;丹参素通过抗氧化、抗炎、抗凋亡等作用减少炎症因子和自由基等对细胞的损伤,维持内皮细胞稳态并保护内皮细胞;丹参素主要通过抑制单核细胞的活化和泡沫细胞的形成,减少促炎因子的释放和抑制血管平滑肌细胞的增殖发挥抗动脉粥样硬化的作用^[7]。丹参酮 II_A 的作用主要为阻止动脉

表 2 GO 富集分析
Table 2 GO enrichment analysis

类别	GO 编号	名称	基因数	FDR
生物过程	GO:0007271	synaptic transmission, cholinergic	6	0.006 814
生物过程	GO:0045944	positive regulation of transcription from RNA polymerase II promoter	21	0.008 623
生物过程	GO:0006954	inflammatory response	13	0.011 861
分子功能	GO:0016907	G-protein coupled acetylcholine receptor activity	4	0.012 783
生物过程	GO:0007197	adenylate cyclase-inhibiting G-protein coupled acetylcholine receptor signaling pathway	4	0.015 761
生物过程	GO:0007207	phospholipase C-activating G-protein coupled acetylcholine receptor signaling pathway	4	0.025 096
分子功能	GO:0003707	steroid hormone receptor activity	6	0.043 457
细胞组成	GO:0016529	sarcoplasmic reticulum	5	0.061 621
生物过程	GO:0007200	phospholipase C-activating G-protein coupled receptor signaling pathway	6	0.120 076
生物过程	GO:0033138	positive regulation of peptidyl-serine phosphorylation	6	0.159 244
分子功能	GO:0004937	alpha1-adrenergic receptor activity	3	0.173 667
生物过程	GO:0007213	G-protein coupled acetylcholine receptor signaling pathway	4	0.197 035
生物过程	GO:0045599	negative regulation of fat cell differentiation	5	0.269 963
分子功能	GO:0048763	calcium-induced calcium release activity	3	0.345 576
分子功能	GO:0005219	ryanodine-sensitive calcium-release channel activity	3	0.345 576
细胞组成	GO:0045211	postsynaptic membrane	8	0.348 925
生物过程	GO:0071880	adenylate cyclase-activating adrenergic receptor signaling pathway	4	0.411 267
生物过程	GO:0007204	positive regulation of cytosolic calcium ion concentration	7	0.419 875
生物过程	GO:0001994	norepinephrine-epinephrine vasoconstriction involved in regulation of systemic arterial blood pressure	3	0.423 688

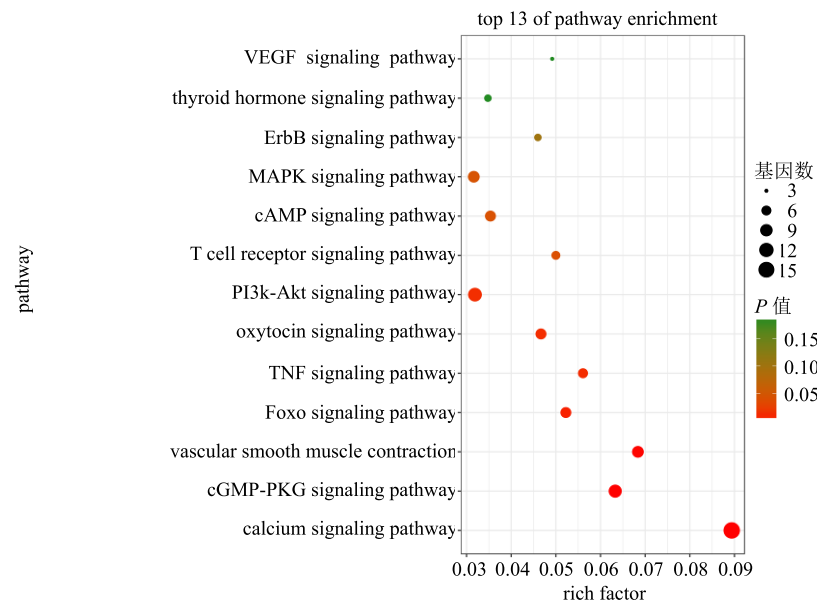


图 4 KEGG 通路富集分析
Fig. 4 KEGG pathway enrichment analysis

粥样硬化形成、缩减主动脉内膜脂质斑块面积、抑制血管平滑肌细胞增殖、减少内膜增生、减少巨噬细胞浸润、抑制丝裂原活化蛋白激酶活性等^[8]。丹皮酚具有抑制主动脉平滑肌细胞增殖及抗自由基作用，并通过抑制血小板聚集和释放而显著减轻食饵性动脉粥样硬化模型主动脉内膜病变肉眼定级及病理分级，抑制粥样硬化斑块形成^[9]。丹皮酚能降低全血表观黏度、红细胞压积、红细胞聚集性和血小

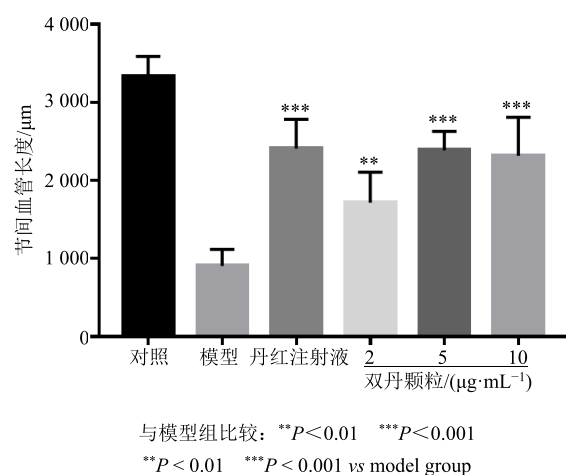


图 5 双丹颗粒对斑马鱼节间血管生成的促进作用 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)
Fig. 5 Effects of Shuangdan Granules on vascular effects in zebrafish ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

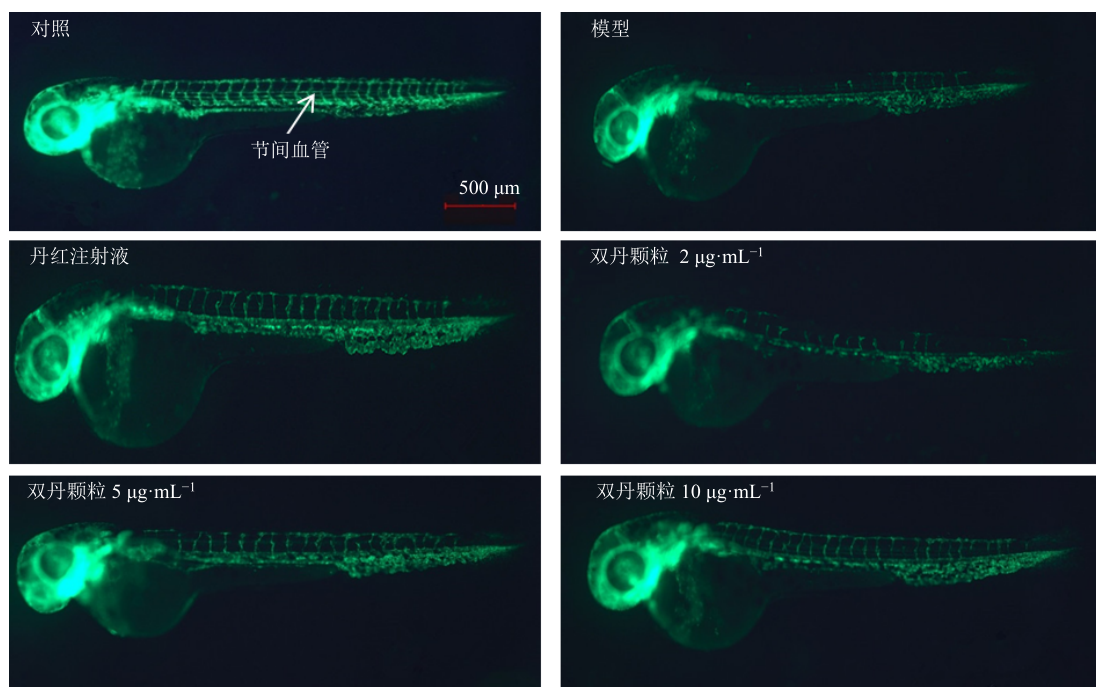


图 6 各组斑马鱼节间血管荧光图
Fig. 6 Effects of Shuangdan Granules on zebrafish internode blood vessels

内皮型一氧化氮合酶 (endothelial nitric oxidesynthase, eNOS)、半胱天冬酶-9 (caspase-9)、雷帕霉素靶蛋白 (mammalian target of rapamycin, mTOR)、Bax 和 Bcl-2 等, 进而调节细胞的增殖、凋亡、分化以及迁移等^[10]。PTGS2 参与疼痛、炎症反应、肿瘤新生、动脉粥样硬化、CHD 等多种信号转导。有报道指出, 环氧合酶-2 (COX-2) 参与了动脉粥样硬化病变的发生、发展^[11-12]。炎症时释放的细胞因子可大量诱导和表达 COX-2, 引起炎症反

板黏附性, 使红细胞的变形能力显著增强^[8]。

双丹方疾病靶点网络分析结果显示, TP53、AKT1、VEGFA、PTGS2 有着较多的作用配体。VEGFA 是血管内皮生长因子 A, 它是通过结合血管内皮生长因子受体 VEGFR-1 和 VEGFR-2 来调节内皮细胞增殖、迁移和促血管新生的。AKT 是 PI3K 信号通路下游的 1 个重要靶点蛋白, PIP3 将 AKT 聚集到细胞膜, 而不能直接使 AKT 磷酸化, 需要和磷酸肌醇依赖性蛋白激酶-1 (phosphoinositide-dependent kinase-1, PDK1) 结合, 最终 PDK1 将 AKT 蛋白的 Thr308 磷酸化; PDK2 将 AKT 蛋白的 Ser473 磷酸化, 从而促使 AKT 完全激活。活化的 AKT 通过磷酸化作用, 可调控下游多个靶蛋白促凋亡分子 Bcl-2/Bcl-xL 相关的死亡启动因子 (Bcl-2/Bcl-xL associated death promoter, Bad)、

应的放大和增强, 同时 COX-2 mRNA 和蛋白显著升高, 提示两者相关。COX-2 可诱导 VEGF 合成, 促进新生血管形成, 促使粥样斑块病变及扩大^[13]。

对双丹方疾病靶点进行 PPI 网络构建, 对网络拓扑分析后发现了双丹方活性成分的多个潜在靶点与多种复杂疾病紧密相关的关键靶点, 如 MAPK1、TP53、AKT1、VEGFA、MAPK8、IL6 等。为了说明作用靶点在基因功能和信号通路中的作用, 本研究进行了 GO 功能富集分析和 KEGG 通路富集分

析。发现双丹方主要能够调节 RNA 调节、炎症反应、G 蛋白偶联、类固醇激素受体活性、细胞分化、血管收缩等方面功能。大多数的基因富集到包括 VEGF 信号通路、FXO 信号通路、ErBb 信号通路、平滑肌收缩信号通路等。丹参有明显改善血液流变性作用,通过降低血液黏滞性使血流加速、降低血管阻力,抑制血小板聚集和释放^[14-15],提高纤溶酶活性,促进纤维蛋白溶解,有抗血栓形成、抗凝血及抑制血小板聚集等作用^[16]。丹参酮 II_A 通过抑制丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 途径 (如 Erk-2 磷酸化^[17]) 来阻止血小板活化。对冠心病的血管新生能增加缺血区血管,从而改善症状,治疗性血管新生在缓解症状和改善预后中占有重要地位^[18], VEGF 主要通过其下游 PLVγ1、PI3K-AKT 信号通路促进内皮细胞增殖,VEGF-AKT 是经典的促内皮细胞增殖与存活,抑制细胞凋亡、促进血管新生的信号通路^[19]。研究显示 VEGF 通过下游 PI3K-AKT 的信号通路,通过相关死亡启动子 (BAD) 途径抑制细胞凋亡,分别通过 mTORC2 和 FOXO1 促进内皮细胞增殖和血管新生^[20]。双丹方通过降低 P38MAPK 表达,保护内皮细胞的损伤^[21],上调 VEGF 表达可以促进血管新生,稳定动脉粥样硬化^[22];调节 ErBb2 和 ErBb4 可以调节心肌中表皮生长因子受体表达^[23];通过上调 p-AKT、下调 p38MAPK 蛋白表达,改善糖尿病下肢缺血血运重建过程^[24];下调 TPPC6,减少钙离子内流,抑制细胞凋亡^[25]。基于以上预测,本研究采用了血管荧光转基因型 flk1 斑马鱼模型来验证双丹颗粒对斑马鱼节间血管的促进作用。flk1 系斑马鱼是血管内皮生长因子受体 (VEGFR) 标记了绿色荧光蛋白的转基因品系,可以直观观察到药物对 VEGF-VEGFR 信号通路的作用。结果显示,双丹颗粒对于该信号通路有明显的影响,显著促进了血管生成。

CHD 心绞痛属中医“胸痹”“心痛”范畴,其病位在心,主要病机为本虚标实。现代医学研究证明,血液黏滞度增高与 CHD 发生有直接关系^[26];全身炎症也是 CHD 的一个重要病理生理因素^[27]。P38MAPK 信号通路是控制炎症反应最主要的 MAPK 家族成员之一,P38MAPK 信号通路可以上调 TNF-α 的合成,进一步放大炎症反应;激活 P38MAPK 信号通路使平滑肌细胞增殖,促进动脉粥样硬化的发生和发展^[28];减少肿瘤坏死因子-α (TNF-α) 诱导的血管细胞黏附分子-1 (VCAM-1)

表达,减少单核细胞向黏附血管内皮细胞^[29];TNF-α 通过血小板源性生长因子促进血栓形成。同时趋化白细胞,促进平滑肌细胞增生参与斑块形成,内膜增厚及内皮细胞损伤;TNF-α 直接损伤血管内皮细胞,通透性增高,引发脂质在血管壁的沉积;TNF-α 可抑制脂蛋白酶活性,使脂质降解受阻,促进斑块的形成^[30];IL-6 参与血管内皮损伤,诱导单核细胞聚集于血管内皮加重炎症反应;也能促进平滑肌细胞和成纤维细胞增生,释放血小板源性生长因子,致使血小板数量增多,促进血栓形成;同时 IL-6 能加速脂质沉积,促进斑块形成,诱发 CHD。IL-6 还能调节其他细胞因子和黏附分子的表达^[31-32],进一步加重炎症反应。丹参酮 II_A 通过 NF-κB 信号通路抑制转化生长因子-β1 的表达^[33];丹参素通过激活 Akt/Nrf2 信号保护心肌细胞免受缺血-再灌注损伤^[34]。丹参既能避免炎症损伤内皮细胞,又能促使白细胞介素减少,进而实现对炎症反应的有效抑制^[35]。

综上所述,本研究应用网络药理学方法,初步探究了双丹方多成分、多靶点、多通路的复杂机制过程,对进一步理解药物-靶点相互作用机制提供了重要信息,为后续从双丹方中提取有效药物成分治疗 CHD 提供了依据,也对未来论证中医药基础理论的科学性提供了参考。

参考文献

- [1] 陈灏珠. 实用内科学 [M]. 第 11 版. 北京: 人民出版社, 2009.
- [2] 高 耀, 吴 丹, 田俊生, 等. 逍遥散和开心散“同病异治”抑郁症的网络药理学作用机制研究 [J]. 中草药, 2018, 49(15): 3483-3492.
- [3] 白隆博, 马逍遥, 常念伟, 等. 基于整合网络药理学和化学物质组学的灯台叶片的抗炎作用机制研究 [J]. 中草药, 2018, 49(16): 3861-3867.
- [4] 杨志霞, 林 谦, 马 利. 丹参对心血管疾病药理作用的文献研究 [J]. 世界中西医结合杂志, 2012, 7(2): 93-114.
- [5] Wang Y L, Cui T, Li Y Z, et al. Prediction of quality markers of traditional Chinese medicines based on network pharmacology [J]. *Chin Herb Med*, 2019, 11(4): 349-357.
- [6] 张彦琼, 李 梢. 网络药理学与中医药现代研究的若干进展 [J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2015, 29(6): 883-892.
- [7] 王冰瑶, 吴晓燕, 樊官伟. 丹参素保护心血管系统的药理作用机制研究进展 [J]. 中草药, 2014, 45(17): 2571-2575.

- [8] 付 萍. 中药丹参治疗冠心病的药理成分及作用研究 [J]. 中西医结合心血管病电子杂志, 2015, 3(28): 183-184.
- [9] 韦 艳, 陆艳玲, 王荣荣, 等. 槲皮素对缺氧人肝癌细胞 HepG2 增殖及 HIF-1 α 、VEGF 的影响 [J]. 武警医学, 2018, 29(2): 134-137.
- [10] 朱金墙, 宋宛珊, 马 妍, 等. PI3K/Akt 信号通路与血管性痴呆的关系及中药干预作用研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(9): 223-229.
- [11] 张 丽, 张 涛, 朴金花, 等. 大鼠动脉粥样硬化 COX-2 mRNA 表达及白藜芦醇干预的实验研究 [J]. 中国老年学杂志, 2009, 29(9): 1086-1087.
- [12] 聂晶鑫. 环氧化酶-2 与基质金属蛋白酶-13 在人冠状动脉粥样硬化斑块的表达及意义 [D]. 大连: 大连医科大学, 2016.
- [13] 方艳秋, 齐亚灵, 刘 婷, 等. COX-2 和 VEGF 蛋白在 HCC 组织中表达及其与 HCC 血管形成的关系 [J]. 吉林大学学报: 医学版, 2008, 34(5): 864-866.
- [14] 王亚玲, 崔张新, 李方江. 丹参与川芎联合用药对冠心病患者脂代谢及血液流变性的影响 [J]. 时珍国医国药, 2009, 20(9): 2169-2170.
- [15] 冷玉杰. 丹参煎剂对冠心病心绞痛患者血液流变学指标的影响 [J]. 吉林中医药, 2016, 36(3): 249-252.
- [16] 赵 涛, 赵步长, 伍海勤, 等. 丹红注射液处方组分的心脑血管药理研究进展 [J]. 中医临床研究, 2014, 6(24): 47-49.
- [17] Maione F, De Feo V, Caiazza E, *et al.* Tanshinone II_A, a major component of *Salvia miltiorrhiza* Bunge, inhibits platelet activation via Erk-2 signaling pathway [J]. *J Ethnopharmacol*, 2014, 155(2): 1236-1242.
- [18] 张少言, 林赞霄, 陈 浩, 等. 血管新生与冠心病治疗性血管生成 [J]. 心血管病学进展, 2014, 35(1): 55-59.
- [19] 向本旭, 刘婷婷, 孙芳玲, 等. VEGF 相关信号通路在血管新生中的研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2015(12): 81-86.
- [20] Rotllan N, Wanschel A C, Fernández-Hernando A, *et al.* Genetic evidence supports a major role for Akt1 in VSMCs during atherogenesis [J]. *Circul Res*, 2015, 116(11): 1744-1752.
- [21] Wang T, Fu F, Han B, *et al.* Danshensu ameliorates the cognitive decline in streptozotocin-induced diabetic mice by attenuating advanced glycation end product-mediated neuroinflammation [J]. *J Neuroimmunol*, 2012, 245(1/2): 79-86.
- [22] Wang F, Wang L, Li Y, *et al.* PAC-1 and its derivative WF-210 inhibit angiogenesis by inhibiting VEGF/VEGFR pathway [J]. *Eur J Pharmacol*, 2018, doi: 10.1016/j.ejphar.2017.12.035.
- [23] 罗明雄, 陈小丹, 魏 玲. 神经调节蛋白 1 对高糖损伤的心肌细胞的保护作用及其机制 [J]. 中国循环杂志, 2016, 31(9): 902-907.
- [24] 张 超. 四妙勇安汤对糖尿病大鼠肢体缺血的治疗作用及对 Akt、p38MAPK 通路的影响 [D]. 北京: 首都医科大学, 2013.
- [25] Martyn P, Mahaut-Smith. A role for platelet TRPC channels in the Ca²⁺ response that induces procoagulant activity [J]. *Sci Signal*, 2013, doi: 10.1126/scisignal.2004399.
- [26] 郝云涛. PNN50 与冠状动脉慢血流现象相关性研究 [D]. 郑州: 郑州大学, 2016.
- [27] Ren Z H, Tong Y H, Xu W, *et al.* Tanshinone II_A attenuates inflammatory responses of rats with myocardial infarction by reducing MCP-1 expression [J]. *Phytomed Int J Phytother Phytopharmacol*, 2010, 17(3/4): 212-218.
- [28] 王 蒙, 陈绍良. P38MAPK 信号通路 with 心血管疾病关系的研究进展 [J]. 现代生物医学进展, 2012, 12(30): 5968-5970.
- [29] Nizamutdinova I T, Kim Y M, Jin H, *et al.* Tanshinone II_A inhibits TNF- α -mediated induction of VCAM-1 but not ICAM-1 through the regulation of GATA-6 and IRF-1 [J]. *Int Immunopharmacol*, 2012, 14(4): 650-657.
- [30] 宋春来, 刘 茵, 李 琳, 等. 肿瘤坏死因子 α 、脂联素对冠心病的影响分析 [J]. 心肺血管病杂志, 2013, 32(5): 608-610.
- [31] 崔占前, 徐延敏. 白介素与急性冠脉综合征关系的研究进展 [J]. 中国循证心血管医学杂志, 2014, 6(1): 114-116.
- [32] 王 淳, 刘丽梅, 宋志前, 等. 心血管疾病常用中药注射液及相关中药有效组分研究概况 [J]. 中草药, 2015, 46(15): 2315-2328.
- [33] Tu S, Xiao F, Min X, *et al.* Catechin attenuates coronary heart disease in a rat model by inhibiting inflammation [J]. *Cardiovasc Toxicol*, 2018, 18(5): 393-399.
- [34] Yu J, Wang L, Akinyi M, *et al.* Danshensu protects isolated heart against ischemia reperfusion injury through activation of Akt/ERK1/2/Nrf2 signaling [J]. *Int J Clin Exp Med*, 2015, 8(9): 14793-14804.
- [35] 董 军, 姜 华, 陈树涛. 白细胞介素-6、白细胞介素-10、肿瘤坏死因子- α 与冠心病关系的初步研究 [J]. 天津医药, 2014, 42(11): 1112-1113.