

• 实验研究 •

基于网络药理学桃核承气汤防治脓毒症心肌功能障碍的作用机制探讨

庄燕, 戴林峰, 鲁俊

南京中医药大学附属医院, 江苏 南京 210029

摘要: 目的 运用计算机网络药理学技术预测桃核承气汤治疗脓毒症心肌功能障碍的作用靶点和信号通路, 进一步分析其防治脓毒症心肌功能障碍的基础和作用机制。方法 运用中药系统药理学成分分析平台 Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology Database and Analysis Platform (TCMSP) 数据库获取桃核承气汤的有效成分及作用靶标基因, 从 GeneCards 数据库收集脓毒症心肌功能障碍的靶标基因, 将两者取交集后得到疾病-药物蛋白靶基因, 运用 STRING 构建蛋白质间相互作用网络, 并通过 Cytoscape 软件将结果进行网络可视化展示, 通过网络结构和节点间加权重联系的计算分析算法筛选出作用的关键基因。借助 Webgestalt 在线工具进行疾病-药物交集靶基因的基因本体论 (GO) 分析和京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 通路富集分析, 并可视化展示。最后利用 CTD 数据库并结合文献学习, 获取关键基因于脓毒症心肌功能障碍的疾病治疗作用。结果 桃核承气汤的 135 个化合物中有 64 成分通过 20 个靶点与脓毒症心肌功能障碍相互关联。其中 AKT1、HMOX1、JUN、TNF、IL1B、MAPK14、NOS3、PPARG、ICAM1、NOS2、VCAM1、STAT1 等关键基因主要通过调控炎症反应、促进细胞存活、抗细胞凋亡、参与能量代谢、病原识别、毒物代谢等路径, 在质膜、细胞膜、吞噬细胞、线粒体自噬等分子反应中发挥作用。结论 网络药理学方法科学预测桃核承气汤防治脓毒症心肌功能障碍的关键靶标及其参与的相关通路, 提示该方剂对脓毒症心肌功能障碍的防治作用为多靶点、多通路、多选择的复杂机制, 并且多与抗炎、抗细胞凋亡、促进细胞存活等机制相关。

关键词: 桃核承气汤; 脓毒症心肌功能障碍; 网络药理学; 关键基因

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1674-5515(2021)03-0421-07

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2021.03.001

Mechanism of Taohe Chengqi Decoction in treating sepsis-induced myocardial dysfunction based on network pharmacology

ZHUANG Yan, DAI Lin-feng, LU Jun

Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210029, China

Abstract: Objective To explore the potential therapeutic targets of Taohe Chengqi Decoction for sepsis-induced myocardial dysfunction based on network pharmacology. **Methods** The active constituents and target genes of Taohe Chengqi Decoction were screened based on TCMSP and Uniprot database. Target genes of sepsis-induced myocardial dysfunction were screened by gene cards database, and the intersection between the targets associated with the components of Taohe Chengqi Decoction and sepsis-induced myocardial dysfunction was performed and visualized by Venn diagram. Cytoscape software was used to construct 'active component-target' interaction network diagram. The same target genes were uploaded to the STRING database, the protein interaction network map (PPI) was constructed, and core genes were screened by using R language. Gene Ontology (GO) enrichment and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genome (KEGG) pathway enrichment of key targets were analyzed using functional enrichment analysis web tool Webgestalt 2019. **Results** The 64 active components and 20 effective targets of Taohe Chengqi Decoction in the treatment of sepsis-induced myocardial dysfunction were predicted. Core genes in PPI network are RAC-alpha serine/threonine-protein kinase(AKT1), Heme oxygenase 1(HMOX1), Transcription factor AP-1(JUN), etc. GO enrichment analysis shows that it can affect acute inflammatory response, muscle cell proliferation, reactive oxygen species metabolic process, extrinsic apoptotic signaling

收稿日期: 2020-09-28

基金项目: 国家中医药管理局“西学中”骨干人才培养项目; 江苏省中医药局科技项目 (JD2019SZ03)

作者简介: 庄燕, 女, 汉族, 江苏淮阴人, 副主任医师, 博士, 专业方向为心血管重症中西医结合治疗。E-mail: athena2004112@163.com

pathway, etc. Enrichment analysis of KEGG pathway showed that AGE-RAGE signaling pathway in diabetic complications and fluid shear stress and atherosclerosis pathways were the most significant pathways, followed by TNF signaling pathway and Toll-like receptor signaling pathway. **Conclusions** Based on network pharmacology, Taohe Chengqi Decoction can treat sepsis-induced myocardial dysfunction by multiple targets and multiple pathways, such as anti-inflammatory, anti-apoptosis, promote cell survival.

Key words: Taohe Chengqi Decoction; sepsis-induced myocardial dysfunction; network pharmacology; core gene

脓毒症心肌功能障碍 (sepsis-induced myocardial dysfunction, SIMD) 是脓毒症器官功能障碍的重要环节, 具有发生早、发生率高的特点, 将明显增加脓毒症患者死亡率^[1]。SIMD 又称脓毒症心肌病, 目前尚无统一定义, 一般认为系脓毒症导致的心脏收缩和/或舒张功能障碍。1984 年, Parker 等^[2]首次发现脓毒症患者中发生了可逆性心肌功能障碍。SIMD 的具体机制仍未完全阐明, 临床治疗亦存在一定难度。目前认为: 作为脓毒症过程中的靶器官之一, 炎症反应不仅直接损伤心肌, 还通过影响心肌细胞的线粒体功能、心脏的肾上腺素受体、心肌细胞钙离子转运、心肌细胞凋亡以及心脏微循环等环节, 导致心肌功能障碍^[3]。因此, 积极探索 SIMD 机制, 并对有效作用靶点进行早期干预, 对于保护患者心肌功能, 改善预后具有重要意义。中药复方具有多靶点、多机制的特点, 通过辨证论治可较好治疗脓毒症, 也为 SIMD 的治疗提供思路。

桃核承气汤出自张仲景所撰《伤寒论》^[4]。《伤寒论 辨太阳病 脉证并治篇》106 条“太阳病不解, 热结膀胱, 其人如狂, 血自下, 下者愈, 其外不解者, 尚未可攻, 当先解其外, 外解已, 但少腹急结者, 乃可攻之, 宜桃核承气汤”。方剂组成为桃仁、大黄、桂枝、炙甘草、芒硝, 全方共 5 味药物, 原方主要治疗邪热传入下焦与瘀血互结所致下焦蓄血证, 为“大黄类方”的活血化瘀剂, 具有凉血化瘀、通下之功。随着对疾病病机认识的深入, 有学者认为运用桃核承气汤的核心不应在于病位, 而应突出审明病机, 只要存在瘀热互结, 不论病位在下焦还是上焦, 均可化裁运用^[5-6]。国医大师周仲瑛教授根据临床验证和实验研究, 提出“瘀热”发病学说, 认为内科领域多种急难病症均存在“瘀热”病理因素^[7]。瘀热病机在临床所表现的证候为瘀热相搏证, 此时, 无形之热毒以有形之瘀血为依附, 并互相搏结。瘀热互搏, 热壅血瘀, 闭阻心脉是 SIMD 的关键。

前期临床应用桃核承气汤治疗腹腔感染导致的脓毒症患者时发现患者心肌损伤标志物(心肌酶谱、肌钙蛋白)水平下降迅速, 且心脏收缩功能无明显

异常。提示桃核承气汤或可用于“瘀热互结”所致 SIMD, 但具体机制尚不明确。近年来系统生物学的研究能比较直观地揭示药物发挥的网络结构, 生物信息学的蓬勃发展也为明确中药复方的机制提供了可能性^[8]。本研究运用网络药理学方法, 探寻桃核承气汤治疗 SIMD 的作用靶点和信号通路, 以求寻找桃核承气汤干预 SIMD 的机制, 为后续实验验证提供参考。

1 材料和方法

1.1 桃核承气汤作用靶点预测

TCMSP 数据库 (<http://lsp.nwu.edu.cn/tcmsp.php>) 中选择“Herb name”分别检索桃仁、桂枝、大黄、炙甘草的分子吸收、分布、代谢、排泄 (ADME) 参数, 以口服生物利用度 (OB) $\geq 30\%$ 和类药性 (DL) ≥ 0.18 筛选出桃核承气汤中可能的活性成分^[9]。使用 Perl 语言并结合 Uniprot 数据库 (<http://www.uniprot.org>), 最终得到桃核承气汤的基因靶点。

1.2 SIMD 靶点预测

使用 GeneCards 数据库 (<https://www.genecards.org/>), 以“sepsis-induced myocardial dysfunction”为关键词进行检索, 从而获得 SIMD 的全部作用靶点, 选择相关度 (relevance 值) 大于 1 的靶点作为目标靶点。运用 Venn diagram (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>) 把疾病靶点与桃核承气汤的靶点进行对比, 筛选出共同的靶点, 并绘制韦恩图。

1.3 网络模型的构建及分析

将桃核承气汤和 SIMD 共作靶点输入到 STRING 数据库 (<https://string-db.org/>) 进行检索, 选取 minimum required interaction score > 0.9 的蛋白相互作用网络 (PPI), 同时显示设置隐藏游离点, 然后下载 PPI 图形件并保存, 最后使用 R 语言对得到的 PPI 进行核心基因的筛选。将桃核承气汤和 SIMD 共同的靶点进行整理, 把所得数据导入 Cytoscape3.7.1 软件, 并对其参数进行设置后得到桃核承气汤的“活性成分-靶点”相互作用网络图。

1.4 基因本体 (GO) 功能分析和京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 通路富集分析

将桃核承气汤和 SIMD 共作靶点输入到

Webgestalt 网站 (<http://www.webgestalt.org>) 分析, 得到 GO 和 KEGG 富集分析的条形图、火山图及包含 P 值的结果, 结果显示 P 值最小的前 10 个。

2 结果

2.1 药物-疾病靶标的预测结果

除去 TCMSP 数据库中没有的芒硝, 桃核承气汤方剂中其余 4 味中药满足 $OB \geq 30\%$ 、 $BL \geq 0.18$, 及剔除重复活性成分, 总共得到 135 有效成分。在 DrugBank 数据库中查询桃核承气汤的活性成分作用靶点共 152 个, 在 GeneCards 数据库中检索 SIMD 相关疾病靶点 (相关度 >1) 共 190 个, 绘制韦恩图得到药物-疾病共同作用靶点 20 个 (图 1)。通过 Cytoscape3.7.1 软件将桃核承气汤活性成分与 20 个靶基因相关的 64 个成分与 20 个 SIMD 相关潜在靶点相连, 绘制出桃核承气汤的“活性成分-靶点”相互作用的网络图 (图 2)。在图 2 中, 棱形节点代表作用靶点, 矩形节点代表活性成分。经 Cytoscape 软件对图 2 进行分析后显示, 槲皮素 (quercetin) 具有最多的潜在靶点 14 个, 其次是山柰酚 (kaempferol) 有 13 个, 排名第 3 的是甘草异黄酮

(licoisoflavone) 有 8 个。从作用靶点的角度进行分析得到, 诱导型一氧化氮合酶 (NOS2) 有着最多的相互作用配体, 为 47 个, 其次是过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (PPARG) 与丝裂原活化蛋白激酶 14 (MAPK14), 分别有 42、31 个相互作用配体。这说明桃核承气汤的同一活性成分能作用于多靶点, 而同一靶点可以受不同活性成分影响, 反映出桃核承气汤治疗时具有多成分、多靶点调节的特点。

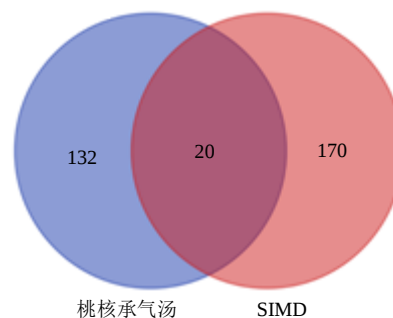


图 1 桃核承气汤与 SIMD 共同靶点韦恩图

Fig. 1 Venn diagram of common target of Taohe Chengqi Decoction and SIMD

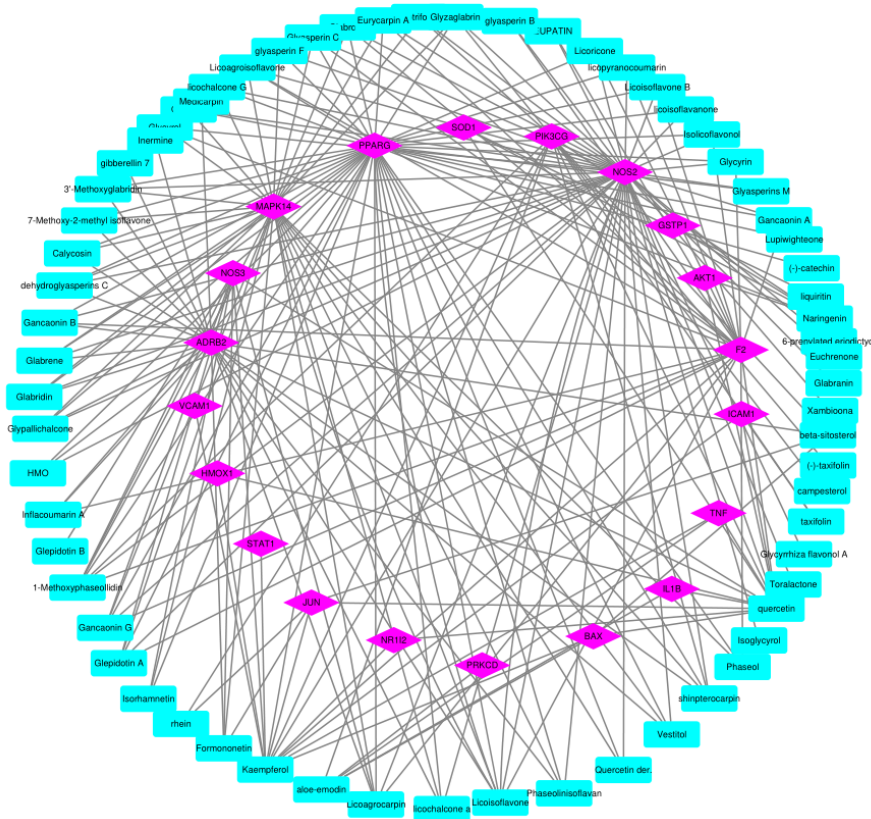


图 2 桃核承气汤活性成分-靶点相互作用网络

Fig. 2 Interaction network of active components and targets of Taohe Chengqi Decoction

2.2 桃核承气汤与 SIMD PPI 的构建及其核心基因

将韦恩图得到的共同作用的 20 个潜在靶点基因录入 STRING 数据库中进行分析得到 PPI(图 3), 其中包含 20 个节点, 100 条边, 平均节点度值 (Degree) 为 10, PPI 富集 P 值少于 1.0×10^{-16} , 节点表示蛋白, 每条边表示蛋白与蛋白之间的相互作用, 线条越多则表示关联度越大。将 STRING 中下载的 tsv 文件用 R 语言进行处理, 得到 PPI 中的核心基因丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 (AKT1/Akt)、血红素加氧酶-1 (HMOX1)、转录因子 AP-1 (JUN)、肿瘤坏死因子 (TNF) 等 (图 4)。

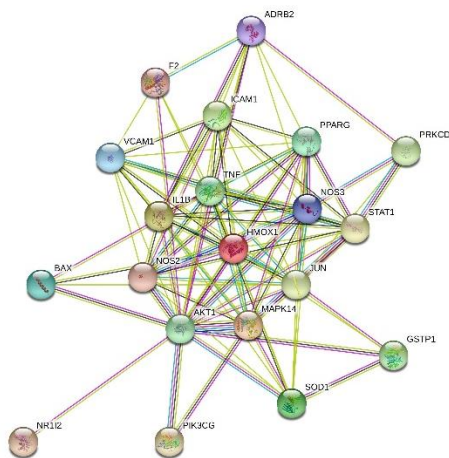


图 3 共同作用靶点的蛋白质相互作用网络

Fig. 3 PPI network of interaction targets

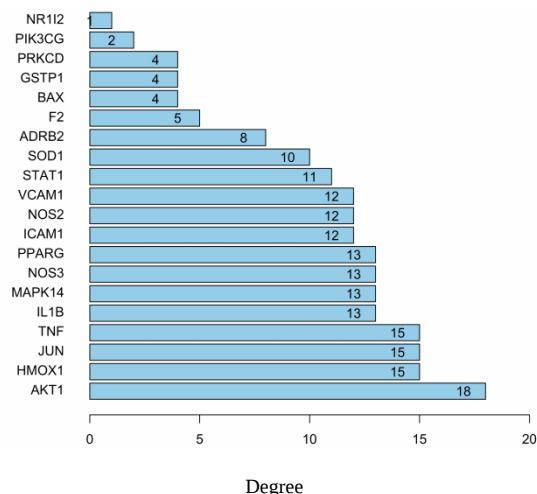


图 4 共同作用靶点 PPI 的核心基因

Fig. 4 Core genes of PPI

2.3 GO 功能富集分析

Webgestalt 网站在线分析后共得到 79 个功能, 前 10 个功能的 GO 功能富集的条形图及火山图见图 5、6。GO 功能富集后富集数目较多的如急性炎症反应 (acute inflammatory response)、肌细胞增殖 (muscle cell proliferation)、活性氧代谢过程 (reactive oxygen species metabolic process)、体外凋亡信号通路 (extrinsic apoptotic signaling pathway)、细胞对生物刺激的反应 (cellular response to biotic stimulus) 等。

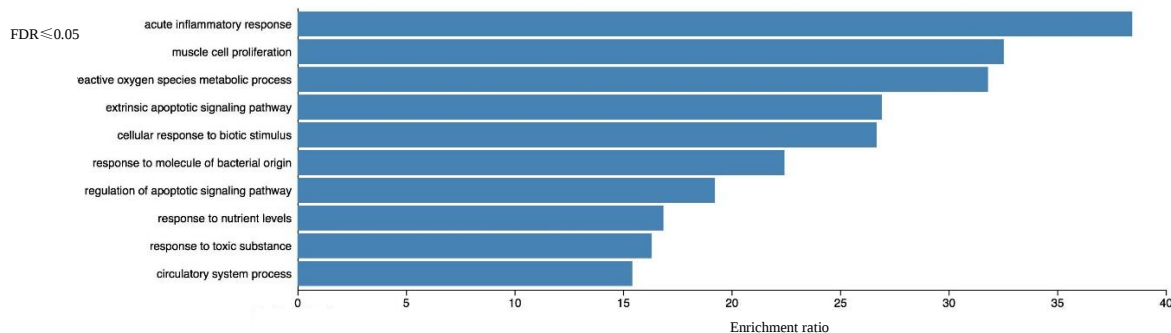


图 5 共同作用靶点的 GO 功能富集的柱状图

Fig. 5 Histogram of GO function enrichment of interaction targets

2.4 KEGG 通路富集分析

Webgestalt 网站在线分析后共得到 44 个通路, 前 10 条通路的条形图及火山图见图 7、8。结果显示, 桃核承气汤治疗 SIMD 涉及有糖尿病并发症中的糖基化终末产物及其受体信号通路 (AGE-RAGE signaling pathway in diabetic complications)、流体剪切力及动脉硬化 (fluid shear stress and atherosclerosis)、肿瘤坏死因子信号通路 (TNF

signaling pathway)、Toll 样受体信号通路 (Toll-like receptor signaling pathway)、C 型凝集素受体信号通路 (C-type lectin receptor signaling pathway)、利什曼病 (Leishmaniasis)、A 型流感 (influenza A) 等。

3 讨论

本研究结果显示, 通过 TCMSP 数据库筛选出桃核承气汤中 4 味中药 (桃仁、桂枝、大黄、炙甘草) 满足 $OB \geq 30\%$ 、 $BL \geq 0.18$ 的有效成分共 135

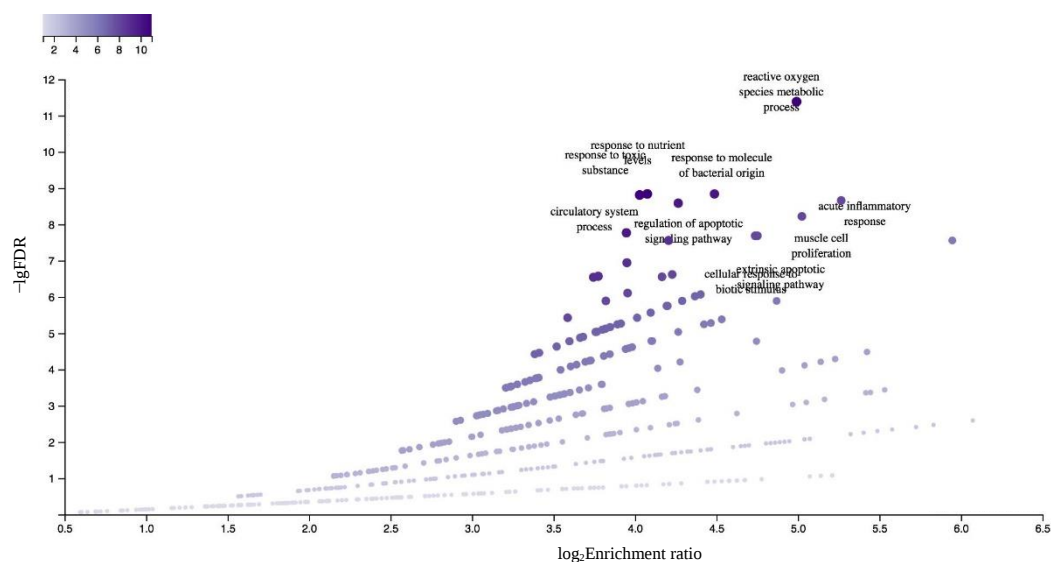


图 6 共同作用靶点的 GO 功能富集的火山图

Fig. 6 Volcanic plot of GO function enrichment of interaction targets

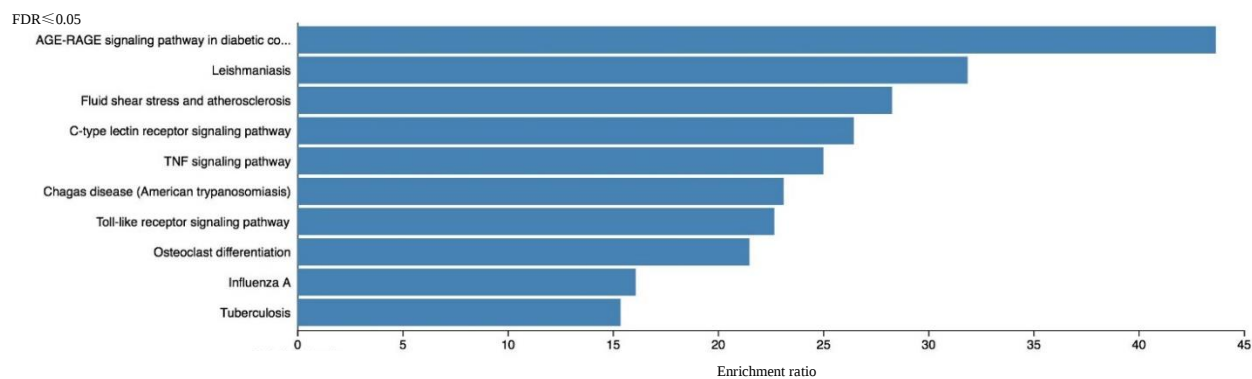


图 7 共同作用靶点的 KEGG 通路富集的柱状图

Fig. 7 Histogram of KEGG pathway enrichment of interaction targets

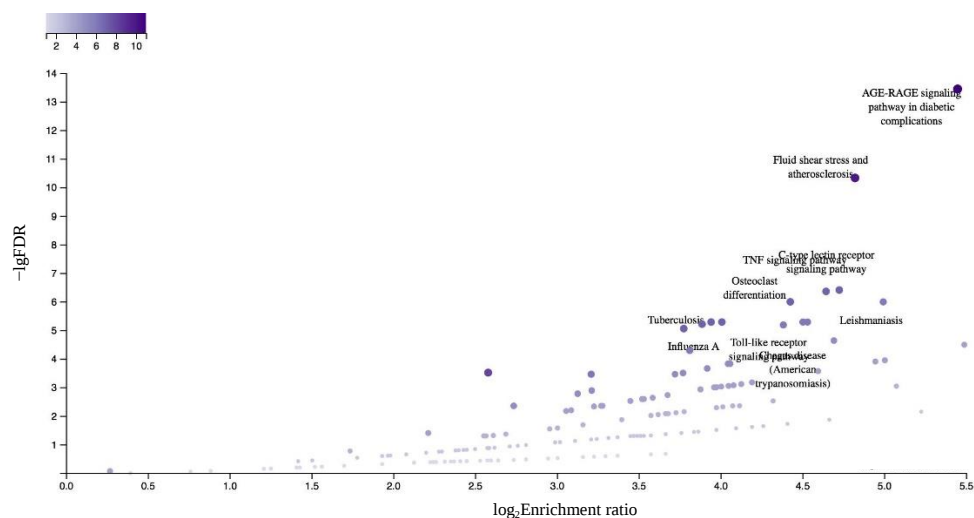


图 8 共同作用靶点的 KEGG 通路富集的火山图

Fig. 8 Volcanic plot of KEGG pathway enrichment of interaction targets

个,其作用靶点共152个,SIMD相关疾病靶点共190个,在线绘制韦恩图得到药物-疾病共同作用靶点20个。Cytoscape软件绘制的桃核承气汤的活性成分-靶点相互作用的网络图显示桃核承气汤的同一活性成分能作用于多靶点,而同一靶点可以受不同活性成分影响,反映出桃核承气汤治疗时具有多成分、多靶点调节的特点。活性成分中靶点最多的成分为槲皮素、山柰酚及甘草异黄酮。现代研究发现,槲皮素具有抗氧化、抗病毒、抗炎作用等多重生物活性。在细胞和动物实验中可以用来治疗肝、心、脾、肺、肾、骨科疾病、神经系统疾病等^[10-11]。山柰酚与槲皮素具有相似的化学结构,能够抗氧化、抗炎、抗癌,可以防治糖尿病、动脉粥样硬化,具有保护神经、肝脏和心肌以及抑制蛋白激酶活性等作用^[12]。甘草异黄酮具有抗炎、抗肿瘤、抗菌等药理作用,能够辅助治疗肿瘤、肺炎、动脉硬化、肝损伤等^[13]。

应用STRING数据库对药物-疾病共同作用20个靶点基因进行蛋白相互作用分析,结果显示蛋白相互作用的核心基因为丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶(AKT1/Akt)、血红素加氧酶-1(HMOX1)、转录因子AP-1(JUN)、肿瘤坏死因子(TNF)等,提示桃核承气汤主要通过作用于AKT1、HMOX1、JUN、TNF等发挥防治SIMD的作用。其中AKT1/Akt活化后可通过磷酸化作用激活或抑制其下游靶蛋白Bad、Caspase9、NF- κ B、GSK-3、FKHR、p21Cip1和p27Kip1等,起到调节细胞的增殖、分化、凋亡以及迁移等作用^[14]。HMOX1可被氧化应激诱导,具有抗氧化、抗细胞凋亡等作用^[15]。转录因子AP-1是一个调控多种基因转录的重要因子,参与细胞增殖、分化和凋亡,研究发现在心血管疾病及肿瘤发生中起到重要的作用^[16]。以上结果提示,桃核承气汤防治SIMD主要通过作用于调控心肌细胞凋亡、细胞增殖、抗炎、抗氧化等功能的基因起作用。

GO功能富集分析显示,桃核承气汤活性成分会影响细胞增殖、细胞凋亡、炎症反应、细胞能量代谢等方面。近年对SIMD发生机制的研究发现,SIMD的病理生理并非是不可逆性坏死,而是类似心肌细胞“冬眠”样的能量代谢下调,主要涉及细胞凋亡及线粒体能量代谢异常^[17],而这与桃核承气汤作用机制一致。KEGG通路富集分析显示,桃核承气汤活性成分可通过多种信号通路发挥作用,其中药物-疾病共同作用的核心基因

AKT1/Akt、JUN、TNF等主要通过肿瘤坏死因子信号通路及Toll样受体信号通路发挥调节细胞的增殖、分化、凋亡以及迁移等,从而防治SIMD。课题组前期动物预试验发现,ig给予桃核承气汤可减轻脓毒症心肌损伤大鼠的心肌损伤程度,降低心肌酶谱及肌钙蛋白水平,这提示桃核承气汤可以起到心脏保护作用。

尽管应用网络药理学可以帮助挖掘中药的潜在作用靶点^[18],为进一步的研究提供思路,但也存在明显不足。首先,不能从更加整体的角度来阐明桃核承气汤防治SIMD的作用机制;其次,因为TCMSP数据库仅纳入了中草药的成分分析,未能对方剂中芒硝作用进行分析,不能排除加入芒硝后作用靶点会发生变化;另外,TCMSP数据库中药物活性成分筛选时参考相关文献设置了OB $\geq$ 30%,BL $\geq$ 0.18要求,该筛选阈值可能导致部分有活性报道的成分遗漏,不排除对结果的影响;最后,此分析结果仅为理论数据,需要进一步的实验研究及临床应用来证明。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Kakehana Y, Ito T, Nakahara M, et al. Sepsis-induced myocardial dysfunction: pathophysiology and management [J]. *J Intensive Care*, 2016, 4: 22.
- [2] Parker M M, Shelhamer J H, Bacharach S L, et al. Profound but reversible myocardial depression in patients with septic shock [J]. *Ann Intern Med*, 1984, 100(4): 483-490.
- [3] Walley KR. Sepsis-induced myocardial dysfunction [J]. *Curr Opin Crit Care*, 2018, 24(4): 292-299.
- [4] 张仲景. 伤寒论 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2005, 4.
- [5] 张婷婷, 王 蕾, 董 宁, 等. 王蕾运用桃核承气汤临证经验 [J]. *中医药通报*, 2018, 17(3): 12-14.
- [6] 马新建, 虞 舜. 桃核承气汤临床应用概述 [J]. *实用中医药杂志*, 2010, 26(2): 142-144.
- [7] 吴勉华, 过伟峰, 周学平, 等. 研究周仲瑛“瘀热”学说的思路与方法 [J]. *中华中医院杂志*, 2009, 24(10): 1319-1321.
- [8] Liao Y X, Wang J, Jaehnig E J, et al. WebGestalt 2019: gene set analysis toolkit with revamped UIs and APIs [J]. *Nucleic Acids Res*, 2019, 47(W1): 199-205.
- [9] 严诗楷, 赵 静, 窦圣姍, 等. 基于系统生物学与网络生物学的现代中药复方研究体系 [J]. *中国天然药物*, 2009, 7(4): 249-259.

- [10] 马 纳, 李亚静, 范吉平. 槲皮素药理作用研究进展 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2018, 20(8): 221-224.
- [11] 贾 静, 刘增娟, 朱臻宇, 等. 槲皮素抗阿霉素诱导心肌毒性的网络多靶点研究 [J]. 中草药, 2019, 50(18): 4364-4371.
- [12] 张雅雯, 邵东燕, 师俊玲, 等. 山柰酚生物功能研究进展 [J]. 生命科学, 2017, 29(4): 400-405.
- [13] 张明发, 沈雅琴. 甘草及其活性成分抗炎与抗炎机制的研究进展 [J]. 现代药物与临床, 2011, 26(4): 261-268.
- [14] Zhang Z, Yao L, Yang J, et al. PI3K/Akt and HIF-1 signaling pathway in hypoxia-ischemia (Review) [J]. *Mol Med Rep*, 2018, 18(4): 3547-3554.
- [15] Waza A A, Hamid Z, Ali S, et al. A review on heme oxygenase-1 induction: is it a necessary evil [J]. *Inflamm Res*, 2018, 67(7): 579-588.
- [16] Bejjani F, Evanno E, Zibara K, et al. The AP-1 transcriptional complex: Local switch or remote command? [J]. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*, 2019, 1872(1): 11-23.
- [17] Stanzani G, Duchon M R, Singer M. The role of mitochondria in sepsis-induced cardiomyopathy [J]. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2019, 1865(4): 759-773.
- [18] 杨 娟, 于晓涛, 郭丽娜, 等. 金银花抗肺癌作用机制的网络药理学研究 [J]. 药物评价研究, 2020, 43(2): 213-222.

【责任编辑 刘东博】