

仲景炮附子对慢性心力衰竭的治疗作用及机制研究

焦鸣杰, 李欣欣, 刘淑明, 陈倩, 陈冬玲, 尹贻慧, 张凯, 魏龙吟, 张佳*, 李飞*

北京中医药大学 中药学院, 北京 102488

摘要: 目的 研究仲景炮附子 *Aconiti Lateralis Radix Preparata* 对慢性心力衰竭 (CHF) 的治疗作用, 并采用超高效液相色谱四级杆静电场轨道阱高分辨质谱 (UPLC-QE-Orbitrap-MS) 测定仲景炮附子水煎液的成分, 结合网络药理学探究其治疗 CHF 的作用机制。方法 采用 ip 盐酸阿霉素构建大鼠 CHF 模型, ig 给予仲景炮附子水煎液 (3.3 g·kg⁻¹) 16 d 后, 试剂盒法检测血清脑钠素 (BNP) 含量、心肌组织 Ca²⁺-ATP 酶和 Na⁺, K⁺-ATP 酶活性, 苏木素-伊红 (HE) 染色后镜下观察左心室组织病理学形态变化。采用 UPLC-QE-Orbitrap-MS 测定仲景炮附子水煎液的成分, 借助 Swiss Target Prediction、DrugBank、Gene Cards、OMIM、TTD 等平台预测仲景炮附子治疗 CHF 的作用靶点, 利用 Cytoscape 软件构建相关作用网络, 并对核心基因进行基因本体论 (GO) 功能富集分析和京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 通路富集分析。结果 与对照组比较, 模型组大鼠出现稀便、腹水、体重减轻等现象; 血清 BNP 水平显著升高 ($P < 0.01$); Ca²⁺-ATP 酶、Na⁺, K⁺-ATP 酶活力均有降低趋势; 左心室心肌组织切片出现明显的心肌纤维断裂, 心肌间隙增宽, 出现部分空泡变性等病理变化。与模型组比较, 仲景炮附子水煎液组大鼠稀便情况得到一定程度改善, 腹水和体重消瘦情况改善不明显; BNP 水平显著降低 ($P < 0.05$); Ca²⁺-ATP 酶、Na⁺, K⁺-ATP 酶活力均有升高趋势; 左心室组织病理学形态有明显改善。采用 UPLC-QE-Orbitrap-MS 共鉴定出仲景炮附子水煎液主要成分 52 个。通过网络药理学预测得到仲景炮附子治疗 CHF 活性成分 43 个, 活性成分靶点 472 个, CHF 疾病靶点 1 063 个, 活性成分与疾病交集靶点 68 个; 网络分析结果表明, 仲景炮附子可能通过作用于信号转导与转录激活子 3 (STAT3)、磷脂酰肌醇-4, 5-二磷酸 3-激酶催化亚基 α (PIK3CA)、MAPK1 等关键靶点发挥抗 CHF 作用, 涉及到 RAS 相关蛋白 1 (Rap1)、磷脂酰肌醇 3'-激酶 (PI3K)-蛋白激酶 B (Akt)、丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 等信号通路。结论 仲景炮附子对阿霉素诱导的慢 CHF 有一定的治疗作用, 可通过多成分、多靶点、多途径发挥作用。

关键词: 仲景炮附子; 阿霉素; 慢性心力衰竭; 网络药理学; 超高效液相色谱-四级杆-静电场轨道阱高分辨质谱

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376 (2022) 10-1980-12

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2022.10.007

Effect and mechanism of Zhongjing's Paofuzi on chronic heart failure

JIAO Mingjie, LI Xinxin, LIU Shuming, CHEN Qian, CHEN Dongling, YIN Yihui, ZHANG Kai, WEI Longyin, ZHANG Jia, LI Fei

School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488, China

Abstract: Objective To study the therapeutic effect of Zhongjing's Paofuzi on chronic heart failure (CHF), and use UPLC-QE-Orbitrap-MS to determine the components of Zhongjing's Paofuzi decoction, combined with network pharmacology to explore its mechanism of action in the treatment of CHF. **Methods** The rat model of CHF was established by the ip of adriamycin hydrochloride. After 16 days of Zhongjing's Paofuzi decoction (3.3 g·kg⁻¹), the serum brain natriuretic peptide (BNP) level, the activities of Ca²⁺-ATP and Na⁺, K⁺-ATP enzymes in cardiac myocytes, and the cardiac histopathology were measured. UPLC-QE-Orbitrap-MS was used to determine the components of Zhongjing's Paofuzi decoction, and the Swiss Target Prediction, DrugBank, Gene Cards, OMIM, and TTD platforms were used to predict the target of Zhongjing's Paofuzi in the treatment of CHF, and Cytoscape software was used to construct the correlation of effect network, and GO analysis and KEGG pathway enrichment for core genes were performed. **Results** Compared with the control group, the model group showed loose stool, ascites and weight loss, the serum BNP level was significantly increased ($P < 0.01$), and the activities of Ca²⁺-ATPase and Na⁺-K⁺-ATPase decreased. Besides, the myocardial tissue sections of the left ventricle showed obvious myocardial fiber rupture, widened myocardial space, and

收稿日期: 2022-04-18

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (81973479)

第一作者: 焦鸣杰, 女, 硕士研究生, 研究方向为中药炮制原理研究。E-mail: jmj9898@163.com

*共同通信作者: 李飞, 教授, 研究方向为中药炮制工艺、原理及质量标准研究。E-mail: lf668@sina.com

张佳, 讲师, 研究方向为中药炮制原理研究。E-mail: zhangjucm@163.com

some pathological changes, such as vacuolar degeneration. Compared with model group, the loose stool of rats in Zhongjing's Paofuzi decoction group was improved to a certain extent, but the ascites and body weight loss were not improved significantly, the serum BNP level was decreased ($P < 0.05$), and the activities of Ca^{2+} -ATP and Na^{+} , K^{+} -ATP enzymes tended to increase. The histopathological morphology of left ventricle was significantly improved. A total of 52 main components of Zhongjing's Paofuzi decoction were identified by UPLC-QE-Orbitrap-MS. According to the network pharmacology prediction, 43 active components, 472 active component targets, 1 063 CHF disease targets and 68 intersection targets of active components and disease were obtained. The results of network analysis showed that Zhongjing's Paofuzi may exert its anti-heart failure effect by acting on key targets such as signal transduction and transcription activator 3(STAT3), Phosphatidylinositol-4, 5-diphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha (PIK3CA), mitogen-activated protein kinase 1 (MAPK1), involving signaling pathways such as Ras-associated protein 1(Rap1), phosphatidylinositol 3'-kinase (PI3K)-Protein kinase B (Akt), and MAPK. **Conclusion** Zhongjing's Paofuzi has a certain therapeutic effect on CHF induced by adriamycin, and can treat CHF through the multi-component, multi-target and multi-way.

Key words: Zhongjing's Paofuzi; adriamycin; chronic heart failure; network pharmacology; UPLC-QE-Orbitrap-MS

慢性心力衰竭(CHF)是心功能不全的一种类型,临床表现为乏力、呼吸困难、心悸、下肢水肿等综合病症,是造成心脏病患者死亡的最主要原因之一,死亡率高达50%以上^[1]。中医治疗CHF历史悠久,根据其临床表现,CHF可归属于“心悸”“喘证”“水肿”“心水”“痰饮”等范畴^[2]。中医认为CHF的病机关键在于心气阳虚^[3],因此古今中医名家常用温通心阳之法治疗心阳虚。

附子为温阳圣药,具有回阳救逆、补火助阳之功,被誉为“回阳救逆第一品药”,治病保命“药中四维”^[4]。现代研究表明,附子具有显著的强心作用^[5-10],是治疗CHF方剂中使用频率最高的前10位中药之一^[11]。仲景炮附子是《伤寒论》中的特色饮片,在《伤寒论》中张仲景用干热法“炮”附子以制其毒,长于温经扶阳、温阳制水,为补命门真火之要药,常用来治疗心衰、阳虚等症^[12]。课题组前期研究中模拟仲景炮附子与《中国药典》2020年版附子饮片进行比较,发现仲景炮附子中虽仍保留有一定量的毒性成分双酯型生物碱,但符合药典的限量规定,达到了减毒的效果;同时药效成分单酯型生物碱和水溶性生物碱含量远高于药典附子饮片^[13-14]。目前,关于附子治疗CHF的研究多集中于药典收录的黑顺片、炮附片,含附子的药对,以及含附子的方剂^[15-20],未见关于仲景炮附子治疗CHF的研究报道。因此,本实验采用阿霉素构建大鼠CHF模型,通过观察大鼠症状体征和心肌病理组织切片,检测血清脑钠素(BNP)含量,心肌细胞 Ca^{2+} -ATP酶和 Na^{+} , K^{+} -ATP酶活性,研究仲景炮附子对CHF的治疗作用。此外,目前未见对仲景炮附子成分鉴定的报道,故采用超高效液相色谱-四级杆-静电场轨道阱高分辨质谱(UPLC-QE-Orbitrap-MS)对仲景炮附子中的化学成分进行表征,以全面分析其化学组成,

并结合网络药理学探究仲景炮附子抗CHF的作用靶点及分子机制,为进一步深入研究提供参考依据。

1 材料

1.1 主要仪器

切片机(型号2235)、脱水机(型号200S)、包埋机(型号EG11),均购于上海莱卡公司;超高分辨率小动物超声影像系统(型号Vevo 2100, Visualsonics公司);Spectrostar Nano全波长酶标仪(Biotek Instruments Inc公司);电热恒温水浴锅(Bluepard公司);超高效液相色谱-四级杆-静电场轨道阱高分辨质谱(UPLC-QE-Orbitrap-MS)(配备Thermo Ultimate 3000超高效液相色谱, HESI热喷雾离子源, Xcalibur 4.2化学工作站)购于美国Thermo Scientific公司。

1.2 药物及主要试剂

仲景炮附子是以生附片为对象,按照课题组之前研究的炮制工艺^[13],经砂烫所得。生附片(批号190701),购于四川江油中坝附子科技发展有限公司,经北京中国食品药品检定研究院张继主任药师鉴定为毛茛科植物乌头 *Aconitum carmichaeli* Debx. 的干燥子根。

阿霉素(批号58647, Med Chem Express公司);BNP测试盒(批号L200715016, 武汉云克隆科技股份有限公司);BCA蛋白定量测定试剂盒(货号B5000, LABLEAD公司);超微量 Na^{+} , K^{+} -ATP酶测定试剂盒(货号A070-2-2),超微量 Ca^{2+} -ATP酶测定试剂盒(货号A070-4-1),均购于南京建成生物工程研究所;纯净水(杭州娃哈哈集团有限公司)。

甲醇为色谱级,乙腈和甲酸均为质谱级,均购于美国Thermo Fishier公司;蒸馏水(深圳屈臣氏蒸馏水有限公司)。

1.3 实验动物

SPF级雄性SD大鼠,2月龄,体质量(180±20)g,购自斯贝福(北京)生物技术有限公司,实验动物生产

许可证号 SCXK(京)2019-0010, 饲养于北京中医药大学实验动物中心, 室温 22~25 °C, 相对湿度 60%, 实验期间 12 h/12 h 昼夜明暗交替。本实验经北京中医药大学实验动物伦理委员会批准(批准文号 BUCM-4-2021071901-3023)。

2 方法

2.1 仲景炮附子水煎液抗 CHF 作用体内研究

2.1.1 仲景炮附子水煎液的制备 称取仲景炮附子 33 g, 加入 10 倍量蒸馏水浸泡 30 min, 置于多用电炉上煎煮, 水沸开始计时, 煎煮 30 min, 药渣再加 8 倍量蒸馏水煎煮 30 min, 合并 2 次煎液, 减压浓缩为 0.33 g·mL⁻¹ 的给药溶液(对水煎液中 3 种双酯型生物碱: 新乌头碱、次乌头碱、乌头碱及 3 种单酯型生物碱: 苯甲酰新乌头原碱、苯甲酰乌头原碱、苯甲酰次乌头原碱进行含量测定, 3 种双酯型生物碱总量为 0.005 8%, 3 种单酯型生物碱总量为 0.047 2%。对水煎液中 7 种水溶性生物碱: 盐酸多巴胺、胞嘧啶核苷、尿苷、去甲猪毛菜碱、鸟嘌呤核苷、腺苷、去甲乌药碱进行含量测定, 水煎液中 7 种水溶性生物碱总量为 0.254 9%), 置于 4 °C 冰箱中备用。

2.1.2 大鼠 CHF 模型的制备 模型制备方法参照文献报道^[21]进行改进, ip 阿霉素, 递加剂量 1.0、1.5、2.0、2.5 mg·kg⁻¹, 每个剂量给药 2 次, 隔日给药, 共 8 次, 最终累计剂量 14 mg·kg⁻¹, 共持续 16 d。对照组按相同方法 ip 相同剂量生理盐水。

2.1.3 造模后心功能及血清 BNP 水平检测 造模结束后, 大鼠 ip 2% 戊巴比妥钠麻醉, 剂量为 3.0 mL·kg⁻¹。将大鼠仰卧固定于鼠板上, 胸前剃毛, 小动物超声影像系统探头置于左胸部, 记录左心室舒张末期内径(LVEDD)、左心室收缩末期内径(LVESD)、左心室射血分数(EF)、左心室短轴缩短率(FS)。大鼠经眼眶取血, 将血液 3 000 r·min⁻¹ 离心 10 min 分离得血清, 参照试剂盒说明检测 BNP 水平。

2.1.4 分组及给药 造模成功的大鼠随机分为模型组和仲景炮附子水煎液(3.3 g·kg⁻¹, 剂量参考文献报道设置^[21])组, 每组 8 只, ig 给药, 每天 1 次, 连续给药 16 d。对照组和模型组大鼠每天 ig 生理盐水。

2.1.5 行为观察 实验期间每日称大鼠体质量, 观察精神状态、皮毛情况、呼吸状况、活动情况等。

2.1.6 BNP 水平检测 给药结束后, 大鼠当晚禁食不禁水, ip 2% 戊巴比妥钠麻醉, 剂量为 3 mL·kg⁻¹, 进行心脏取血, 将血液 3 000 r·min⁻¹ 离心 10 min 分离得血清, 参照试剂盒说明检测 BNP 水平。

2.1.7 Ca²⁺-ATP 酶和 Na⁺, K⁺-ATP 酶活力检测 采

血后, 取部分心肌组织, 精确称质量, 保存于 -80 °C 冰箱中。测试时, 制备组织匀浆, 采用 BCA 蛋白定量试剂盒检测蛋白浓度, 按照试剂盒操作说明, 进行酶促反应及定磷操作, 依据说明书计算得 ATP 酶活力。

2.1.8 心脏组织病理学观察 采血后, 取左心室心肌组织, 用 4% 多聚甲醛固定, 脱水后, 采用石蜡包埋, 苏木素-伊红(HE)染色法进行染色, 进行病理学观察。

2.1.9 数据处理 数据分析采用 Graphpad prism 7.0 软件, 实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组数据分析采用 ANOVA 方差分析。

2.2 UPLC-QE-Orbitrap-MS 数据采集与分析

2.2.1 供试品溶液的制备 称取仲景炮附子 10 g, 置于烧杯中, 加入 10 倍量蒸馏水浸泡 30 min, 置于多用电炉上煎煮, 水沸开始计时, 煎煮 30 min, 再加 8 倍量蒸馏水煎煮 30 min, 合并 2 次煎液, 减压浓缩为 100 mg·mL⁻¹ 的母液, 过 0.22 μm 滤膜, 取续滤液即得供试品溶液, 待用。

2.2.2 色谱条件 参照本课题组前期研究方法^[22], 色谱柱为 Waters Acquity UPLC BEH-C₁₈ 柱(2.1 mm×100 mm, 1.7 μm); 体积流量为 0.2 mL·min⁻¹, 进样量为 2 μL; 柱温为 30 °C。流动相 A 为 0.1% 甲酸水, 流动相 B 为乙腈, 洗脱程序: 0~7 min, 96%~85%A; 7~24 min, 85%~70%A; 24~30 min, 70%~67%A; 30~40 min, 67%~40%A; 40~50 min, 40%~0 A; 50~52 min, 100%B; 52~53 min, 0~96%A; 53~57 min, 96%A。

2.2.3 质谱条件 课题组前期对正、负离子模式均进行了考察, 发现负离子模式下化合物种类较少, 且正离子模式的化合物已涵盖负离子模式下的化合物, 故仅采用正离子模式扫描。HESI 离子源正离子模式下进行扫描, 扫描范围 *m/z* 100~1 500; 毛细管温度为 350 °C, 电离源电压、毛细管电压、管透镜电压分别为 4 kV、35 V、110 V; 辅助气体积流量 20 arb, 鞘气体积流量 40 arb, 二者均为氮气。

2.2.4 数据分析 采用 Xcalibur 4.2 软件进行分析。

2.3 基于网络药理学的仲景炮附子抗 CHF 机制研究

2.3.1 “仲景炮附子成分-靶点”获取 选取鉴定的全部仲景炮附子水煎液活性成分作为目标成分, 利用 Pubchem 数据库(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)获得成分的分子式和 SMILES 格式, 进一步将其输入 Swiss Target Prediction(<http://swisstargetprediction.ch/>), 选择物种 Homo sapiens, 选择标准为 Probability>0, 以 Similarity ensemble approach(SEA)(<https://sea.bksslabs.org/>)进行靶点数据补充, 选择标准为 MaxTC=1, 进行仲景炮附子成分靶标预测。

2.3.2 CHF 相关靶标的收集 以“chronic heart failure”为关键词,检索 DrugBank 数据库(<https://www.drugbank.ca/>)、Genecards 数据库(<http://www.genecards.org/>)、OMIM 数据库(<http://omim.org/>)、TTD 数据库(<http://db.idrblab.net/ttd>)等,其中 Genecards 数据库以相关性得分(relevance score) > 20 为标准,整合上述得到的所有靶标,构建疾病靶标数据库。

2.3.3 共有靶点的获取 将“2.3.1”项和“2.3.2”项得到的仲景炮附子成分靶点和 CHF 疾病靶点取交集得到仲景炮附子抗 CHF 的潜在作用靶点,并绘制 Venn 图进行可视化。

2.3.4 构建“药物-成分-疾病-靶点”网络 将“2.3.3”项中获得的药物、疾病的共同靶点基因数据导入 Cytoscape 3.8.0 软件,构建“药物-成分-疾病-靶点”交集网络。

2.3.5 蛋白质相互作用(PPI)网络的构建与分析 将“2.3.4”项获得的潜在作用靶点导入 STRING(<https://string-db.org/>)平台,设定物种为智人,进行 PPI 分析。进一步将分析结果导入 Cytoscape 3.8.0 软件,通过“Analyze Network、cytoHubba”进行拓扑学分析,以节点颜色和大小反映靶点 degree。

2.3.6 基因本体论(GO)功能富集和京都基因与基

因组百科全书(KEGG)通路富集分析 利用 R 语言(Version 4.0.2)进行靶基因 GO 分析和 KEGG 通路富集分析,并将结果以气泡图的形式输出,揭示作用基因的分子生物学功能(MF)、生物学过程(BP)、细胞组分(CC)和代谢途径(pathway)。

3 结果

3.1 仲景炮附子水煎液对 CHF 大鼠的影响

3.1.1 造模后心功能及血清 BNP 水平检测 与对照组比较,模型组大鼠 LVEDD、LVESD 均有降低趋势,EF、FS 均显著降低($P < 0.05$);血清 BNP 水平显著升高($P < 0.01$),结果见图 1。表明大鼠 CHF 模型制备成功。

3.1.2 一般观察 对照组大鼠呼吸状况、精神状态、活动情况正常;模型组大鼠出现稀便、腹水、体质减轻等现象,造模结束时因心衰死亡 1 只;仲景炮附子水煎液组大鼠稀便情况得到一定程度改善,腹水和体型消瘦情况改善不明显。

3.1.3 BNP 水平 给药 16 d 后,仲景炮附子水煎液对大鼠 BNP 水平的影响结果见图 2。模型组与对照组相比,BNP 水平显著升高($P < 0.01$);仲景炮附子水煎液组与模型组相比,BNP 水平显著降低($P < 0.05$),表明仲景炮附子水煎液可显著降低 CHF 大鼠的 BNP 水平。

3.1.4 Ca^{2+} -ATP 酶和 Na^+ , K^+ -ATP 酶活力 如图 2

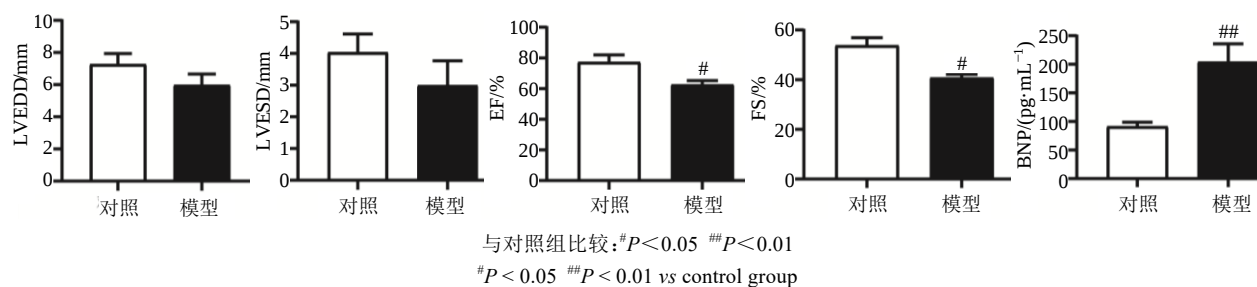


图 1 CHF 大鼠心功能指标及血清 BNP 水平 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 1 Cardiac function parameters and serum BNP level in CHF rats ($\bar{x} \pm s, n=3$)

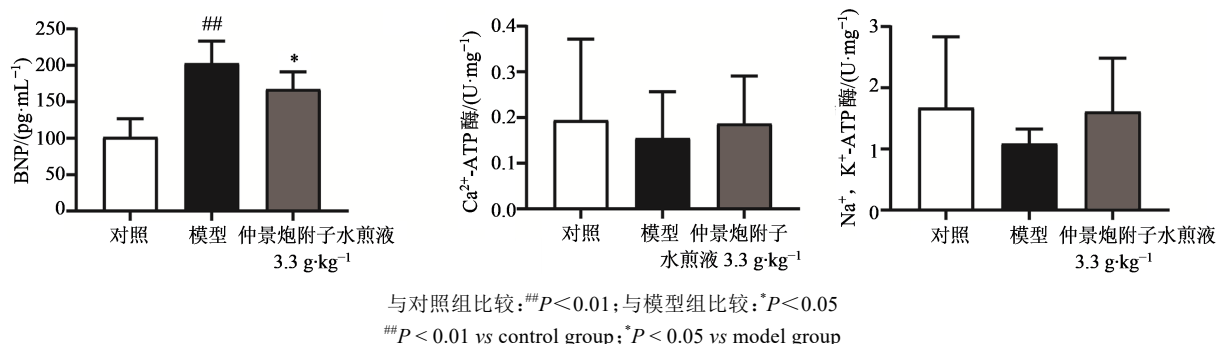


图 2 仲景炮附子水煎液对大鼠血清 BNP 水平及心肌 Ca^{2+} -ATP 和 Na^+ , K^+ -ATP 酶活力的影响 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

Fig. 2 Effects of Zhongjing's Paofuzi decoction on serum BNP level and activities of Ca^{2+} -ATP and Na^+ , K^+ -ATPase in myocardium of rats ($\bar{x} \pm s, n=8$)

所示,模型组与对照组相比, Ca^{2+} -ATP酶、 Na^{+} 、 K^{+} -ATP酶活力均有降低趋势;仲景炮附子水煎液组与模型组相比, Ca^{2+} -ATP酶、 Na^{+} 、 K^{+} -ATP酶活力均有升高趋势,表明仲景炮附子水煎液对CHF大鼠心肌组织能量代谢有一定的改善作用。

3.1.5 心肌组织病理变化 如图3所示,模型组大鼠左心室心肌组织切片较对照组出现明显的心肌纤维断裂,心肌间隙增宽,出现部分空泡变性等病理变化;仲景炮附子水煎液组与模型组相比,心肌组织断裂减少,间隙变窄,空泡减少,表明仲景炮附子水煎液可明显改善CHF大鼠心肌组织的损伤。

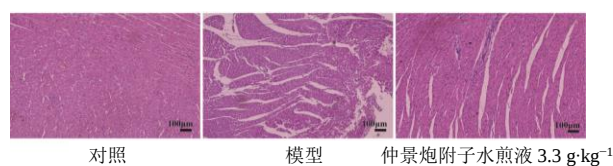


图3 CHF大鼠左心室病理切片(HE染色,×40)

Fig. 3 Pathological changes of the left ventricle in CHF rats (HE staining, ×40)

3.2 仲景炮附子水煎液化学成分鉴定

在ESI正离子电离模式下,仲景炮附子总离子流图见图4,成分鉴定结果见表1。

3.3 基于网络药理学的仲景炮附子抗CHF机制研究

3.3.1 仲景炮附子成分靶点获取 在Pubchem中搜索52个化学成分的SMILES文件,通过Similarity

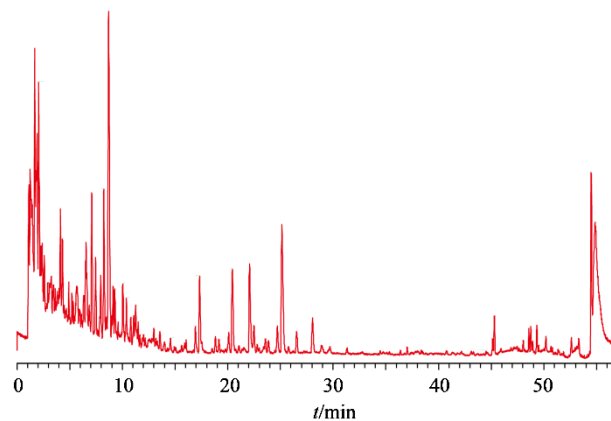


图4 仲景炮附子水煎液总离子流图

Fig. 4 Total ion current diagram of Zhongjing's Paofuzi decoction

表1 仲景炮附子水煎液成分鉴定结果

Table 1 Composition identification results of Zhongjing's Paofuzi decoction

名称	化学式	t/min	m/z 理论值	MS^2	m/z 实测值	峰面积/ ($\text{mAU} \cdot \text{min}$) ($\times 10^{-6}$)	误差/
天冬氨酸	$\text{C}_4\text{H}_7\text{NO}_4$	1.26	134.044 78	132.902 85, 128.019 39	134.044 94	2.05×10^7	1.162
谷氨酸	$\text{C}_5\text{H}_9\text{NO}_4$	1.29	148.060 43	144.982 44, 133.929 87	148.060 55	1.04×10^8	0.781
胞嘧啶核苷	$\text{C}_9\text{H}_{13}\text{N}_3\text{O}_5$	1.37	244.092 79	226.118 70, 204.071 73, 194.326 16	244.093 19	1.44×10^8	1.610
精氨酸	$\text{C}_6\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_2$	1.38	175.118 95	167.981 70, 158.092 76, 158.092 76	175.119 11	5.95×10^9	0.158
缬氨酸	$\text{C}_5\text{H}_{11}\text{NO}_2$	1.46	118.086 25	102.300 77, 91.054 77	118.086 62	2.32×10^8	3.090
苯丙氨酸	$\text{C}_9\text{H}_{11}\text{NO}_2$	1.57	166.086 25	160.348 08, 143.997 06, 136.589 68	166.086 52	4.45×10^8	1.595
尿苷	$\text{C}_9\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_6$	1.71	245.076 81	228.098 53, 216.123 67, 203.103 42	245.077 03	8.33×10^7	0.887
组氨酸	$\text{C}_6\text{H}_9\text{N}_3\text{O}_2$	1.73	156.076 75	139.002 78, 110.071 56	156.076 97	1.98×10^9	1.390
去甲猪毛菜碱	$\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{NO}_2$	1.77	180.101 90	163.075 47	180.102 07	2.92×10^9	0.915
腺嘌呤核苷	$\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{N}_5\text{O}_4$	1.81	268.104 03	250.107 47, 222.086 72	268.104 16	3.91×10^9	0.463
酪氨酸	$\text{C}_9\text{H}_{11}\text{NO}_3$	1.87	182.081 16	181.523 96, 172.063 02	182.081 44	6.18×10^8	1.484
鸟嘌呤核苷	$\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{N}_5\text{O}_5$	1.95	284.098 94	275.193 18, 168.332 02, 152.056 85	284.099 30	7.61×10^8	1.249
新乌头原碱	$\text{C}_{24}\text{H}_{39}\text{NO}_9$	5.40	486.269 75	436.232 73, 454.243 93, 468.260 65	486.270 69	1.11×10^9	1.916
川乌碱甲	$\text{C}_{23}\text{H}_{37}\text{NO}_6$	5.10	424.269 36	406.258 94, 388.248 38, 356.220 76	424.269 81	1.38×10^9	1.050
去甲乌药碱	$\text{C}_{16}\text{H}_{17}\text{NO}_3$	5.85	272.128 11	255.101 49, 237.090 94	272.127 87	3.44×10^6	-0.918
多根乌头碱	$\text{C}_{22}\text{H}_{35}\text{NO}_4$	6.01	378.263 88	360.253 27	378.263 98	2.65×10^9	0.251
异塔拉乌头定	$\text{C}_{23}\text{H}_{37}\text{NO}_5$	6.08	408.274 44	390.263 82, 372.253 23, 358.237 82	408.274 54	5.12×10^9	0.221
乌头原碱	$\text{C}_{25}\text{H}_{41}\text{NO}_9$	6.61	500.285 40	450.248 57, 482.275 57, 468.259 52	500.286 41	1.88×10^8	2.002
宋果灵	$\text{C}_{22}\text{H}_{31}\text{NO}_3$	6.66	358.237 67	340.227 02	358.237 03	9.04×10^9	-1.788
12-表欧乌头碱	$\text{C}_{22}\text{H}_{33}\text{NO}_3$	6.75	360.253 32	342.242 83	360.252 96	1.54×10^9	-1.000
海替生	$\text{C}_{20}\text{H}_{27}\text{NO}_3$	7.07	330.206 37	312.195 83, 300.007 66	330.206 79	5.67×10^8	1.271
次乌头原碱	$\text{C}_{24}\text{H}_{39}\text{NO}_8$	7.80	470.274 84	452.262 85, 438.248 75, 420.238 19	470.275 42	1.06×10^9	1.226

续表1

名称	化学式	t/min	m/z 理论值	MS^2	m/z 实测值	峰面积/ (mAU·min) ($\times 10^{-6}$)	误差/
附子灵	$C_{24}H_{39}NO_7$	7.86	454.279 92	436.269 74	454.279 88	2.12×10^9	-0.108
尼奥灵	$C_{24}H_{39}NO_6$	8.34	438.285 01	420.274 69, 388.248 05	438.284 82	4.00×10^{10}	-0.444
<i>N</i> -ethylhokbusine-B	$C_{24}H_{37}NO_5$	8.81	420.274 44	402.264 07	420.274 90	1.09×10^9	0.450
<i>N</i> -methyl-laurotetanine	$C_{20}H_{23}NO_4$	9.00	342.169 98	324.233 28, 311.125 67, 297.112 21	342.169 95	2.40×10^9	-0.101
黄草乌碱丁	$C_{23}H_{37}NO_4$	9.64	392.279 53	360.253 20	392.280 06	2.39×10^8	1.338
塔拉乌头碱	$C_{24}H_{39}NO_5$	9.79	422.290 09	390.263 89, 372.254 09	422.290 16	3.10×10^9	0.143
塔拉地萨敏	$C_{24}H_{39}NO_5$	9.79	422.290 09	408.606 66, 390.263 82, 372.253 08	422.290 16	3.10×10^9	0.143
光翠雀碱	$C_{22}H_{33}NO_2$	9.85	344.258 40	326.247 59, 300.445 31, 265.194 73	344.259 12	2.39×10^8	2.075
裸翠雀亭	$C_{22}H_{33}NO_2$	9.85	344.258 40	326.248 29	344.258 30	1.70×10^9	-0.307
14-乙酰尼奥灵	$C_{26}H_{41}NO_7$	11.04	480.295 57	462.284 85, 444.275 36, 430.259 64	480.296 14	7.13×10^8	1.168
展花乌头宁	$C_{25}H_{41}NO_6$	11.32	452.300 66	420.274 63, 402.264 92, 388.248 41	452.300 96	1.94×10^9	0.653
去氢松果灵	$C_{22}H_{29}NO_3$	12.33	356.222 02	343.525 60	356.222 23	3.54×10^8	0.589
14-乙酰塔拉胺	$C_{26}H_{41}NO_6$	12.87	464.300 66	432.274 63	464.300 87	1.38×10^9	0.443
盐酸多巴胺	$C_8H_{12}NO_2Cl$	14.23	190.062 93	182.985 20, 174.017 96, 167.976 99	190.062 87	2.90×10^4	-0.311
gadenine	$C_{30}H_{41}NO_8$	17.02	544.290 49	512.264 65	544.290 53	1.26×10^8	0.067
苯甲酰新乌头原碱	$C_{31}H_{43}NO_{10}$	17.15	590.295 97	558.269 84, 540.258 91, 508.233 09	590.295 72	7.77×10^9	-0.428
苯甲酰乌头原碱	$C_{32}H_{45}NO_{10}$	19.11	604.311 62	572.285 16, 554.275 21, 522.247 74	604.311 58	1.29×10^9	-0.071
苯甲酰次乌头原碱	$C_{31}H_{43}NO_9$	20.32	574.301 05	542.274 96, 510.249 39, 482.218 99	574.300 84	1.03×10^{10}	-0.380
脱水苯甲酰新乌头原碱	$C_{31}H_{41}NO_9$	22.14	572.285 40	540.259 7, 522.248 84, 508.231 54	572.285 28	1.03×10^{10}	-0.224
10-羟基中乌头碱	$C_{33}H_{45}NO_{12}$	22.69	648.301 45	616.310 91	648.301 51	4.90×10^5	0.290
新乌头碱	$C_{33}H_{45}NO_{11}$	23.93	632.306 53	600.280 88, 582.269 78, 550.244 38	632.307 25	1.56×10^7	1.127
isodelphinine	$C_{33}H_{45}NO_9$	24.61	600.316 70	568.290 41	600.317 14	4.84×10^7	0.719
脱水中乌头碱	$C_{33}H_{43}NO_{10}$	26.81	614.295 97	582.270 75, 554.273 93, 522.249 15	614.296 33	2.23×10^7	-0.623
次乌头碱	$C_{33}H_{45}NO_{10}$	27.99	616.311 62	556.289 86, 524.264 53, 496.275 51	616.311 77	1.95×10^8	0.239
14- <i>O</i> -anisoylneoline	$C_{32}H_{45}NO_8$	28.90	572.321 79	502.280 36, 484.269 44, 456.273 71	572.322 08	8.20×10^8	0.500
脱水乌头碱	$C_{34}H_{45}NO_{10}$	29.42	628.311 62	588.451 11, 568.290 34, 536.264 28	628.312 26	6.47×10^7	1.014
翠雀花定	$C_{41}H_{43}NO_{12}$	31.03	742.285 80	682.262 7, 620.249 76, 560.230 96	742.286 38	3.44×10^7	0.779
印乌碱	$C_{34}H_{47}NO_{10}$	31.76	630.327 27	598.300 23, 570.306 27, 538.279 72	630.327 45	3.32×10^7	0.281
去氧乌头碱	$C_{34}H_{47}NO_{10}$	31.76	630.327 27	598.300 23, 570.306 27, 538.279 72	630.327 88	3.32×10^7	0.963
delgradine	$C_{42}H_{45}NO_{12}$	36.03	756.301 45	634.265 50, 589.305 30, 521.423 95	756.301 94	5.38×10^6	0.645

ensemble approach (SEA) 和 Swiss Target Prediction 预测靶标, 根据筛选标准, 共得到靶标 1 348 个, 去重后得到仲景炮附子成分靶点 472 个。

3.3.2 CHF 靶点获取 在 Genecards 数据库中获取得到“chronic heart failure”下靶标 10 845 个, 筛选“inflammation”项下“relevance score”大于 20 的靶基因, 得到 569 个; TTD 数据库中共获取靶点 10 个; OMIM 数据库获取靶点 548 个; DrugBank 数据库获取靶点 12 个; 汇总共得 1 139 个, 去重后得到“chronic heart failure”的相关靶点 1 063 个。

3.3.3 仲景炮附子与 CHF 共有靶点的获取 将获取的仲景炮附子成分靶点和 CHF 疾病靶点进行映射对比, 得到 68 个药物与疾病共有靶点, 见图 5。

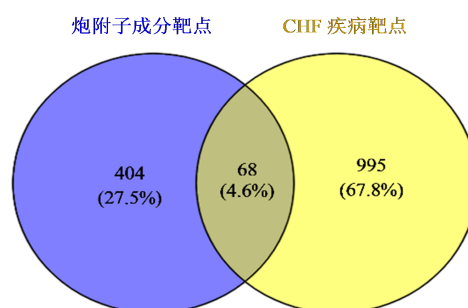


图5 仲景炮附子成分靶点与 CHF 疾病靶点韦恩图
Fig. 5 Venn diagram of targets of Zhongjing's Paofuzi components and CHF disease targets

3.3.4 构建“药物-成分-疾病-靶点”网络 仲景炮附子治疗 CHF 的“药物-成分-疾病-靶点”交集网络见图 6, 其结果表明仲景炮附子水煎液有 43 个成分

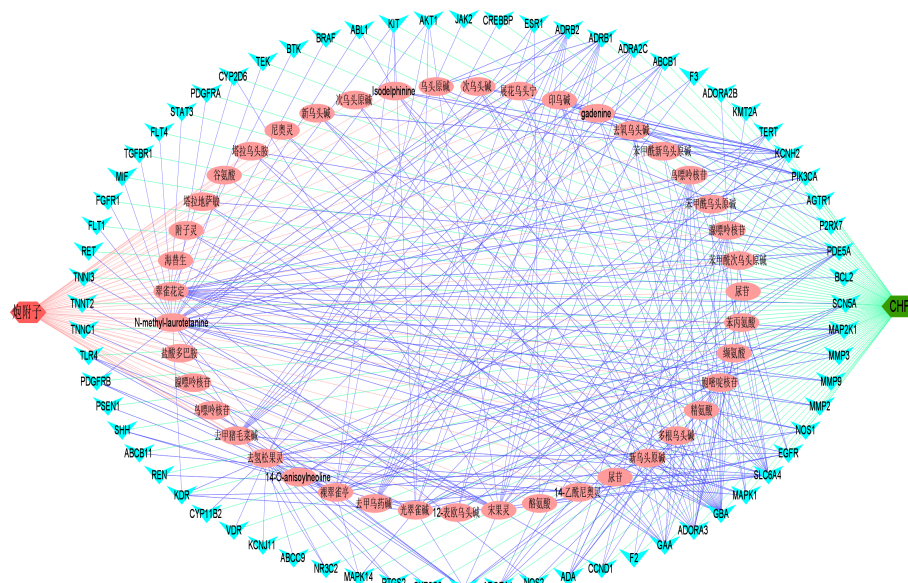


图6 “药物-成分-疾病-靶点”交集网络

Fig. 6 “Drug-ingredient-disease-target” intersection network diagram

参与调控CHF的分子网络。

3.3.5 PPI网络构建与分析结果 将获得的68个靶标导入STRING数据库后,设置隐藏游离点,最低互动得分要求中选择 highest confidence(0.900)。PPI网络图见图7。导出TSV格式的作用关系结果文件,将文件导入Cytoscape 3.8.0软件进行可视化分析,剔除网络中没有作用关系的单个节点,网络共计50个节点,202条边。利用“Analyze Network”功能,获取到“degree”(数值2~38),大于10的有13个,见图8。“degree”从小到大,节点显示从小到大,颜色从橙色至红色。在“cytoHubba”模块,依次用介度中心性(betweenness)、接近中心性(closeness)、度中心性(degree centrality)预测关键靶点,选择前13位的基因,其交集为信号转导与转录激活子3(STAT3)、磷脂酰肌醇-4,5-二磷酸3-激酶催化亚基α(PIK3CA)、丝裂原活化蛋白激酶1(MAPK1)、蛋白酪氨酸激酶2(JAK2)、蛋白激酶B(AKT1)、MAPK14、CREB结合蛋白基因(CREBBP)、MAP2K1,故推测这些基因为仲景炮附子治疗CHF的关键靶点。

3.3.6 GO功能富集分析 利用R语言对仲景炮附子对CHF潜在作用靶点进行GO功能富集分析,以 $P < 0.05$ 为筛选条件,共获得89个MF,72个CC,2012个BP。根据校正 P 值由小到大排序,确定了排名前10条BP相关的GO条目,涉及丝氨酸/苏氨酸激酶活性的正调节、上皮细胞增殖、调节血液循环、MAP激酶活性的调控等;排名前10条MF相关GO条目,包括酪氨酸激酶活性、跨膜受体蛋白激酶

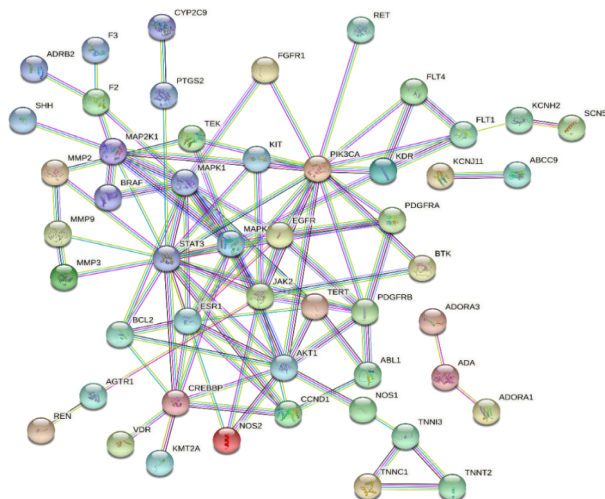


图7 PPI网络

Fig. 7 PPI network diagram

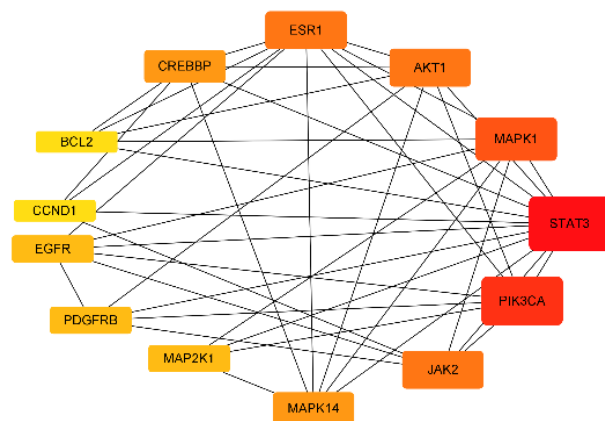


图8 仲景炮附子治疗CHF的关键靶点

Fig. 8 Key targets of Zhongjing's Paofuzi in treatment of CHF

活性、跨膜受体蛋白酪氨酸激酶活性、生长因子结合、血红素结合等;排名前10条CC相关GO条目,依次为膜筏、膜微区、膜区、神经元胞体等。体现了化合物可能调控多个复杂的生物学过程来发挥多种药理作用,将富集结果按显著性排序进行展示,见图9。图中横坐标表示富集在条目上的基因数,纵坐标表示条目名称。颜色越红,代表显著性越大。

3.3.7 KEGG通路富集分析 利用R语言对仲景炮附子对CHF潜在作用靶点进行KEGG通路富集分析,获得75个KEGG通路。根据 P 值由小到大,排名前20的通路涉及RAS相关蛋白1(Rap1)信号通

路、钙信号通路、磷脂酰肌醇3'-激酶(PI3K)-蛋白激酶B(Akt)信号通路、MAPK信号通路、内分泌抵抗、Ras信号通路等。将富集结果按显著性排序进行展示,见图10。图中横坐标代表富集在通路上的基因数,纵坐标代表通路名称。颜色越红,代表显著性越大。

4 讨论

CHF是由多种复杂病因诱发的心肌损伤以及结构和功能的改变,主要表现为心肌收缩能力减弱,EF下降,最终导致心室泵血功能低下^[23]。CHF在中医上属于本虚标实证,以心、肾阳气亏虚为本,以水、痰、浊、湿、瘀为标,中医采用整体观念的辨证

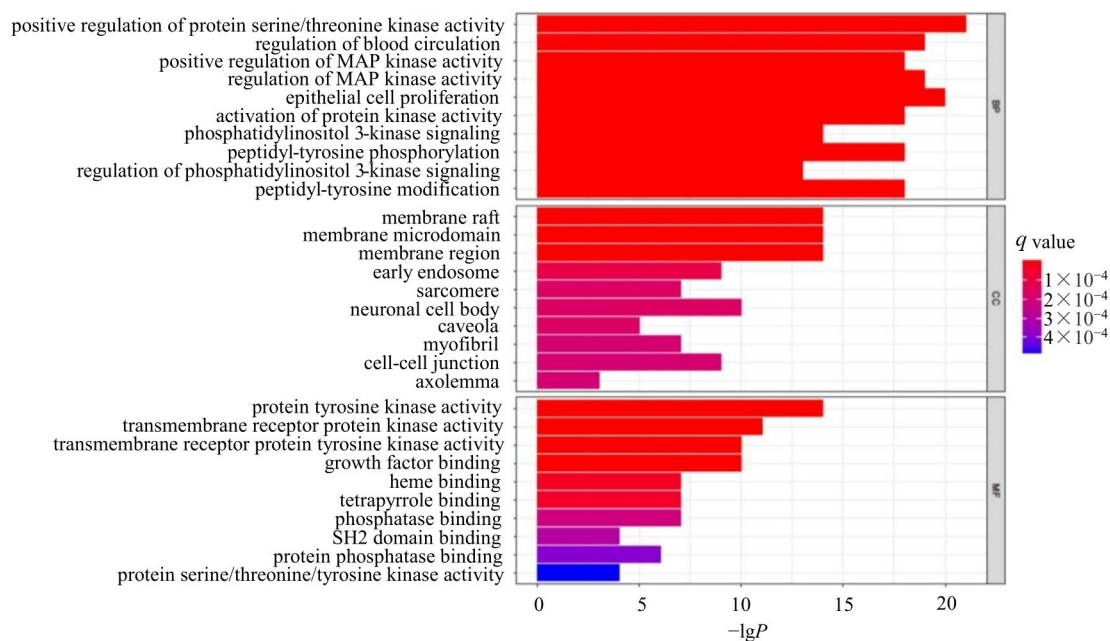


图9 仲景炮附子治疗CHF靶点GO富集分析

Fig. 9 GO enrichment analysis of targets of Zhongjing's PaoFuZi

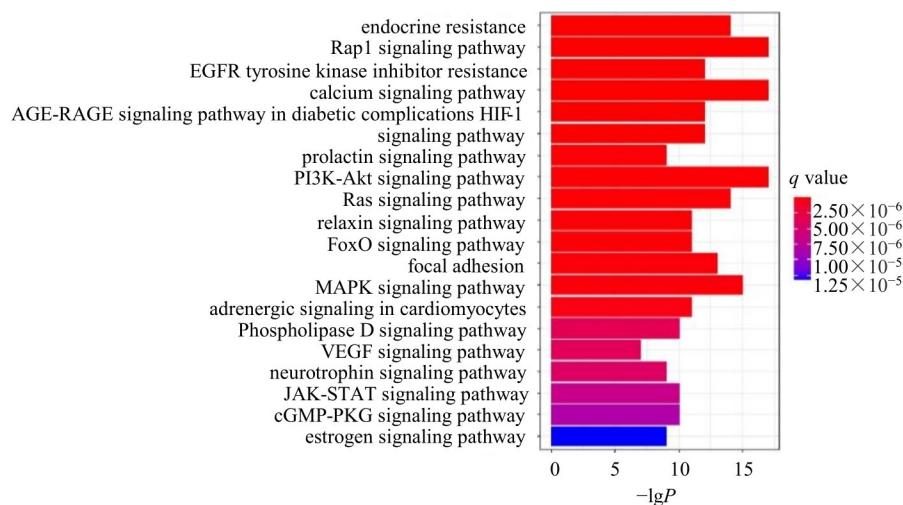


图10 仲景炮附子治疗CHF靶点KEGG通路分析

Fig. 10 Analysis of KEGG pathway of targets of Zhongjing's PaoFuZi

思维,以治病求本为治则,运用温阳扶正祛邪法对于CHF的治疗起到了积极的作用^[24]。附子是中医临床不可缺少的常用药之一,大辛大热,具有回阳救逆之功效,以温阳扶正法改善心功能^[25],被誉为乱世之良将,回阳救逆之第一品。仲景炮附子来源于医圣张仲景的《伤寒论》,为治疗心衰经典方真武汤的君药。

BNP是心肌细胞合成和分泌释放的多肽物质,是诊断CHF的重要指标^[26],能够准确反映心肌细胞承受的压力大小,BNP水平和CHF具有高度相关性^[27],与CHF的程度呈正相关^[28]。Hejl等^[29]研究发现,BNP水平与CHF全因死亡率密切相关,患者的存活率随着BNP水平的增加而降低,并随着年龄和性别调整,BNP每增加1倍,死亡率增加32.3%。CHF患者心肌组织病理变化常表现为心肌细胞排列紊乱,细胞间隙明显增宽,心肌纤维溶解断裂等^[30]。与对照组相比,CHF模型组大鼠BNP水平显著升高,心肌组织出现明显的心肌纤维断裂、空泡,且心肌间隙增宽。仲景炮附子水煎液给药后可显著降低CHF大鼠的血清BNP水平,减小心肌组织纤维间的断裂、细胞间隙和空泡,降低其心力衰竭程度。另外,心脏作为高耗能的器官,对于能量的供给至关重要。能量代谢的改变是导致CHF发病的重要环节之一, Ca^{2+} -ATP酶、 Na^{+} , K^{+} -ATP酶活力与心肌细胞能量代谢的过程密切相关^[31],与对照组相比,模型组 Ca^{2+} -ATP酶、 Na^{+} , K^{+} -ATP酶活力降低,提示心肌能量产生障碍,仲景炮附子水煎液可在一定程度上提高 Ca^{2+} -ATP酶、 Na^{+} , K^{+} -ATP酶活力,表明其参与调节心肌细胞能量代谢过程,对心肌组织的能量代谢具有一定改善作用。

本实验通过网络药理学预测仲景炮附子治疗CHF的关键靶点可能是*STAT3*、*PIK3CA*、*MAPK1*、*JAK2*、*AKT1*、*MAPK14*等,对关键靶点进行KEGG通路富集分析探究其在信号通路中的作用,发现仲景炮附子可能通过钙信号通路、PI3K-Akt信号通路、MAPK信号通路等发挥抗CHF的作用。钙离子是细胞内的第二信使,在心肌细胞动作电位的形成和兴奋-收缩偶联中起着不可或缺的作用,心肌细胞内钙离子的动态平衡可以保证细胞舒张功能正常进行,维持心肌细胞基因表达和正常结构^[32]。PI3K-Akt信号通路是调节心脏功能的重要通路,在心肌细胞生长代谢过程中起着重要作用,通路中的众多受体和激酶与心力衰竭有着密切的联系。PI3K-Akt通路的适度激活可以抑制心肌细胞凋亡,缓解心肌

细胞的纤维化,抑制心室重构,平衡心肌能量代谢,从而改善心功能^[33]。研究发现,PI3K-Akt信号通路的激活可抑制心衰大鼠心脏的纤维化,改善其心室肥厚^[34],抑制心脏组织炎症和氧化应激^[35]。MAPK是一类广泛存在于体内大多数细胞内的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,对心肌细胞的分化、凋亡、增殖及炎症反应起着重要的调节作用。MAPK家族有4个主要分支,分别为细胞外信号调节激酶(ERK)、c-Jun氨基末端激酶(JNK)、p38丝裂原活化蛋白激酶(p38/MAPK)和细胞外信号调节激酶5(ERK5)。相关研究表明^[36],重度心衰病人p38/MAPK激活会导致心肌细胞凋亡坏死,加重心衰;抑制心肌细胞中p38/MAPK活性,可显著减少心肌缺血和再灌注导致的损伤,减少心肌细胞凋亡^[37]。心力衰竭并非简单的心肌泵送功能缺陷,而是影响许多器官、系统的复杂全身炎症疾病^[38]。CHF患者以全身炎症为特征,肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素(IL)-1、IL-6、IL-8等炎症因子会随心力衰竭严重程度加深而升高^[39-42],这些因子会介导多种炎症递质的分泌和释放,继而加重炎症反应,导致血管内皮功能下降,微循环障碍,损伤心肌细胞,加快心肌细胞的坏死、凋亡,引起心肌纤维化和重塑等病理变化,进而加重心衰。PI3K-Akt通路、MAPK信号通路等均对心肌细胞的炎症反应起着调节作用,过度激活的PI3K-AKT信号转导通路会增强促炎因子TNF- α 产生和释放,进而导致细胞因子的失衡,引起炎症反应^[43];MAPK信号通路是经典的炎症通路之一^[44],p38/MAPK、JNK、ERK等作为重要的炎症调控因子,其激活后进入细胞核调控多种转录因子的表达,从而促进炎症细胞的浸润与活化,加剧心衰。研究表明,当心肌细胞损伤时,降低p38浓度水平能够有效控制心肌细胞炎症反应引起的心肌重塑^[45]。

本研究通过体内实验证明仲景炮附子对CHF有治疗作用,可以降低CHF大鼠血清BNP水平,改善其心肌组织病理性损伤,改善心肌组织的能量代谢。使用网络药理学对仲景炮附子治疗CHF的关键靶基因及信号通路进行分析预测,初步揭示了仲景炮附子通过PI3K-Akt信号通路、MAPK信号通路、钙信号通路、Rap1信号通路等来调节血液循环、调节丝氨酸/苏氨酸激酶活性、调节上皮细胞增殖、调控MAP激酶活性等进而治疗CHF,为探明仲景炮附子治疗CHF的作用机制提供一定的理论基础。但本研究未将仲景炮附子与药典附子饮片进行比较,存在一定的局限性。而且中药成分复杂,治疗

疾病的机制复杂,为进一步探明仲景炮附子治疗CHF的作用机制,还需要进一步的实验加以佐证。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 王玉丹, 李佳卓, 赵文霞, 等. 真武汤加减治疗慢性心衰临床疗效的系统评价及试验序贯分析 [J]. 中医药临床杂志, 2021, 33(9): 1733-1739.
Wang Y D, Li J Z, Zhao W X, et al. Systematic review and sequential analysis on clinical efficacy of modified Zhenwu Decoction in treating chronic heart failure [J]. Clin J Tradit Chin Med, 2021, 33(9): 1733-1739.
- [2] 王亚红, 王振涛. 郭维琴教授对心力衰竭的中医认识与辨治 [J]. 河南中医, 2003, 23(10): 12-13.
Wang Y H, Wang Z T. Professor Guo Weiqin's TCM understanding and treatment of heart failure [J]. Henan Tradit Chin Med, 2003, 23(10): 12-13.
- [3] 张艳, 礼海, 王彩玲. 浅谈慢性心衰中医病名病机研究 [J]. 辽宁中医杂志, 2011, 38(1): 12-13.
Zhang Y, Li H, Wang C L. Talking about the research on the name and pathogenesis of chronic heart failure in traditional Chinese medicine [J]. Liaoning J Tradit Chin Med, 2011, 38(1): 12-13.
- [4] 张定堃, 赵志浩, 李春雨, 等. 基于生物毒效检测的附子不同炮制品质量评价研究 [J]. 药学学报, 2019, 54(12): 2169-2177.
Zhang D K, Zhao Z H, Li C Y, et al. Quality evaluation of different processed products of *Aconiti Lateralis Radix* Praeparata combining bioassay and toxicity detection [J]. Acta Pharm Sin, 2019, 54(12): 2169-2177.
- [5] 马君, 程阳阳, 谭鹏, 等. 附子炮制品对阿霉素致急性心力衰竭的实验研究 [J]. 时珍国医国药, 2017, 28(9): 2136-2138.
Ma J, Cheng Y Y, Tan P, et al. Experimental study on processed products of *Aconiti Lateralis Radix* Preparata treated with Adriamycin-induced on acute heart failure [J]. Lishizhen Med Mater Med Res, 2017, 28(9): 2136-2138.
- [6] 卢志强, 张艳军, 庄朋伟, 等. 附子对急性心力衰竭大鼠血流动力学影响及其机制研究 [J]. 中草药, 2015, 46(21): 3223-3227.
Lu Z Q, Zhang Y J, Zhuang P W, et al. Effect of *Aconiti Lateralis Radix* Preparata on hemodynamics of rats with acute heart failure and its mechanism [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2015, 46(21): 3223-3227.
- [7] 李晓宇, 栾永福, 孙蓉. 附子对脾肾阳虚型心衰大鼠的效-毒关联评价 [J]. 中国药物警戒, 2015, 12(8): 449-453.
Li X Y, Luan Y F, Sun R. Evaluation on the "efficacy-toxicity" correlation of *Radix Aconiti Lateralis Praeparata* on spleen-kidney Yang deficiency rat with heart failure [J]. Chin J Pharmacovigil, 2015, 12(8): 449-453.
- [8] 梅超南, 曾瑾, 赵军宁. 不同产地附子炮制品对急性心衰大鼠心功能指标作用的比较研究 [J]. 世界科学技术——中医药现代化, 2014, 16(12): 2652-2657.
Mei C N, Zeng J, Zhao J N. Comparative study on heart function indexes of acute heart failure rats with processed aconite products from different origins [J]. Mod Tradit Chin Med Mater Med World Sci Technol, 2014, 16(12): 2652-2657.
- [9] 吴美平, 董耀荣, 熊旭东, 等. 不同剂量附子对心衰大鼠心室重构作用的研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(16): 187-190.
Wu M P, Dong Y R, Xiong X D, et al. Effects and dose-effect relationship of *Aconiti Lateralis Radix* in praeparata on ventricular remodeling in rats with heart failure following myocardial infarction [J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae, 2012, 18(16): 187-190.
- [10] 陈家琪, 包丹丹, 张悦, 等. 附子-大黄药对治疗阳虚类疾病配伍机制研究进展 [J]. 中草药, 2022, 53(11): 3518-3530.
Chen J q, Bao D d, Zhang Y, et al. Research progress on compatibility mechanism of drug pair of *Aconiti Lateralis Radix Preparata* and *Rhei Radix et Rhizom* treatment of yang deficiency diseases [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2022, 53(11): 3518-3530.
- [11] 史君, 王星, 赵慧辉, 等. 近20年慢性心力衰竭中医现代临床用药规律分析 [J]. 北京中医药大学学报, 2020, 43(10): 841-848.
Shi J, Wang X, Zhao H H, et al. Analysis of TCM prescriptions for chronic heart failure in recent 20 years [J]. J Beijing Univ Tradit Chin Med, 2020, 43(10): 841-848.
- [12] 杨明, 徐楚江, 张为亮. 炮附子的文献探讨 [J]. 中国中药杂志, 1994, 19(11): 664-666.
Yang M, Xu C J, Zhang W L. Literature discussion on Paofuzi [J]. China J Chin Mater Med, 1994, 19(11): 664-666.
- [13] 彭诗涛, 张先灵, 袁金凤, 等. 基于张仲景学术思想的炮附子4种炮制方法的比较研究 [J]. 世界科学技术——中医药现代化, 2018, 20(5): 716-721.
Peng S T, Zhang X L, Yuan J F, et al. A comparative study on 4 kinds of processing methods of paofuzi based on Zhang zhongjing's academic thoughts [J]. Mod Tradit Chin Med Mater Med World Sci Technol, 2018, 20(5): 716-721.
- [14] 陈炯, 谭鹏, 吴月娇, 等. 砂烫生附片与炮附片制备前后6种生物碱的变化 [J]. 中成药, 2016, 38(6): 1342-

1345.
Chen J, Tan P, Wu Y J, et al. Variations of six alkaloids in Shengfupian heated with sand and Paofupian before and after preparation [J]. Chin Tradit Pat Med, 2016, 38(6): 1342-1345.
- [15] 贾雪岩, 林 华, 沈玉巧, 等. 附子新型炮制品中乌头类生物碱测定及其强心作用研究 [J]. 药物评价研究, 2016, 39(2): 224-229.
Jia X Y, Lin H, Shen Y Q, et al. Determination of content of novel aconite processed products and their cardiostimulant effect [J]. Drug Eval Res, 2016, 39(2): 224-229.
- [16] 汪顺浩, 高继海, 陈海媚, 等. 转录组学探讨附子治疗急性心衰大鼠的作用机制 [J]. 中国中药杂志, 2019, 44(1): 131-140.
Wang Q H, Gao J H, Chen H M, et al. Transcriptomics study on mechanism of *Aconiti Lateralis Radix Praeparata* in treatment of rats with acute heart failure [J]. China J Chin Mater Med, 2019, 44(1): 131-140.
- [17] 黄嘉滢, 马子霖, 程天翊, 等. 基于网络药理学的附子-淫羊藿药对治疗慢性心功能不全的作用机制 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(10): 142-151.
Huang J Y, Ma Z L, Cheng T Y, et al. Network pharmacology-based analysis on mechanism of *Aconiti Lateralis Radix Praeparata* and *Epimedii folium* in treatment of chronic heart failure [J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae, 2021, 27(10): 142-151.
- [18] 贾欢欢, 曾业文, 李 航, 等. 附子与山茱萸配伍对慢性心力衰竭大鼠的影响 [J]. 中草药, 2019, 50(2): 418-422.
Jia H H, Zeng Y W, Li H, et al. Effect of compatibility of *Aconitum carmichaelii* and *Cornus officinalis* on chronic heart failure rats [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2019, 50(2): 418-422.
- [19] 李 庆. 附子汤对慢性心力衰竭大鼠心室重构及肾素血管紧张素醛固酮系统的影响 [J]. 新中医, 2015, 47(1): 222-224.
Li Q. Effects of Fuzi Decoction on ventricular remodeling and renin-angiotensin-aldosterone system in rats with chronic heart failure [J]. J New Chin Med, 2015, 47(1): 222-224.
- [20] 刘中勇, 李 林, 方 家. 真武汤对心力衰竭模型大鼠心室重构及心肌细胞凋亡、纤维化的影响 [J]. 中医杂志, 2017, 58(14): 1218-1223.
Liu Z Y, Li L, Fang J. Influence of Zhenwu Decoction on ventricular remodeling and myocardial apoptosis and fibrosis in heart failure model rats [J]. J Tradit Chin Med, 2017, 58(14): 1218-1223.
- [21] 梁 涛, 耿 珊, 周玲玲, 等. 附子干姜配伍对阿霉素致大鼠慢性心衰的治疗作用 [J]. 中国中医急症, 2014, 23(10): 1821-1822, 1862.
Liang T, Geng S, Zhou L L, et al. Study on the compatibility of aconite and dried ginger treating rats with adriamycin-induced chronic heart failure [J]. J Emerg Tradit Chin Med, 2014, 23(10): 1821-1822, 1862.
- [22] Zhang K, Liu C X, Yang T G, et al. Systematically explore the potential hepatotoxic material basis and molecular mechanism of *Radix Aconiti Lateralis* based on the concept of toxicological evidence chain (TEC) [J]. Ecotoxicol Environ Saf, 2020, 205: 111342.
- [23] 王希山, 晋玉梅, 祖建国, 等. 加味补阳还五汤联合瑞舒伐他汀治疗慢性心力衰竭合并心房颤动临床观察 [J]. 山西医药杂志, 2020, 49(20): 2790-2791.
Wang X S, Jin Y M, Zu J G, et al. Clinical observation of modified Buyang Huanwu decoction combined with rosuvastatin in the treatment of chronic heart failure complicated with atrial fibrillation [J]. Shanxi Med J, 2020, 49(20): 2790-2791.
- [24] 胡 芳, 沈金峰, 刘中勇. 基于"扶阳学说"探讨慢性心脏病因病机 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2019, 21(9): 168-170.
Hu F, Shen J F, Liu Z Y. To explore the etiology and pathogenesis of chronic heart failure based on Fuyang theory [J]. J Liaoning Univ Tradit Chin Med, 2019, 21(9): 168-170.
- [25] 蔡虎志, 王笑莹, 陈青扬, 等. 温阳振衰颗粒对慢性心衰模型大鼠心肌CREB表达的影响 [J]. 中成药, 2018, 40(4): 943-946.
Cai H Z, Wang X Y, Chen Q Y, et al. Effects of Wenyang Zhenshuai Granule on the expression of myocardial CREB in chronic heart failure model rats [J]. Chin Tradit Pat Med, 2018, 40(4): 943-946.
- [26] 陈旭蓉, 成 茜. 血浆脑钠肽水平检测在慢性心力衰竭患者病情严重程度及预后评估中的价值分析 [J]. 吉林医学, 2020, 41(2): 392-393.
Chen X R, Cheng H. Analysis of the value of plasma brain natriuretic peptide level in the assessment of severity and prognosis of patients with chronic heart failure [J]. Jilin Med J, 2020, 41(2): 392-393.
- [27] 刘言浩, 梁大虎, 孙 华, 等. HPLC-MS/MS法同时测定参附强心丸中制附子6种生物碱含量 [J]. 皖南医学院学报, 2021, 40(1): 18-21.
Liu Y H, Liang D H, Sun H, et al. Simultaneous determination of six different alkaloids in Shenfuqiangxin pills by HPLC-MS/MS [J]. J Wannan Med Coll, 2021, 40(1): 18-21.
- [28] 张之栩, 魏 群. 血清BNP水平与心衰程度相关性的临床研究 [J]. 中国实验诊断学, 2010, 14(8): 1216-1217.
Zhang Z X, Wei Q. The correlation between the serum Brain Natriuretic Peptide Level and the degree of heart

- failure in 136 patients with heart failure [J]. Chin J Lab Diagn, 2010, 14(8): 1216-1217.
- [29] Hejl J L, Grand M K, Siersma V, et al. Brain natriuretic peptide in plasma as predictor of all-cause mortality in a large Danish primary health care population suspected of heart failure [J]. Clin Chem, 2018, 64(12): 1723-1731.
- [30] 曾瑾, 崔凤娟, 王海珍, 等. 阿霉素诱导和腹主动脉缩窄术复制大鼠慢性心力衰竭模型的比较 [J]. 皖南医学院学报, 2014, 33(3): 189-192.
- Zeng J, Cui F J, Wang H Z, et al. Comparison of the two heart failure models in rats by abdominal aorta constriction and intraperitoneal injection of adriamycin [J]. Acta Acad Med Wannan, 2014, 33(3): 189-192.
- [31] Taegtmeyer H. Energy metabolism of the heart: From basic concepts to clinical applications [J]. Curr Probl Cardiol, 1994, 19(2): 59-113.
- [32] 刘文娟, 陈佩雅, 王艳, 等. 肌浆网钙漏流与心力衰竭 [J]. 中国科学: 生命科学, 2018, 48(1): 24-29.
- Liu W J, Chen P Y, Wang Y, et al. Sarcoplasmic reticulum calcium leak and heart failure [J]. Sci Sin Vitae, 2018, 48(1): 24-29.
- [33] 王明珠, 符德玉, 姚磊, 等. 基于网络药理学研究升陷汤治疗心力衰竭的作用机制 [J]. 中成药, 2021, 43(1): 228-234.
- Wang M Z, Fu D Y, Yao L, et al. Study on the mechanism of Shengxian Decoction in the treatment of heart failure based on network pharmacology [J]. Chin Tradit Pat Med, 2021, 43(1): 228-234.
- [34] Sun G W, Qiu Z D, Wang W N, et al. Flavonoids extraction from *Propolis* attenuates pathological cardiac hypertrophy through PI3K/AKT signaling pathway [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2016, 2016: 6281376.
- [35] Li L, Hao J H, Jiang X, et al. Cardioprotective effects of ulinastatin against isoproterenol-induced chronic heart failure through the PI3K-Akt, p38 MAPK and NF- κ B pathways [J]. Mol Med Rep, 2018, 17(1): 1354-1360.
- [36] 杨丽霞, 魏玲, 王先梅, 等. p38MAPK信号通路的变化在心力衰竭病人心肌重塑中的意义 [J]. 中国急救医学, 2002(5): 268-269.
- Yang L X, Wei L, Wang X M, et al. Activation of p38-mitogen-activated protein kinases in myocardial remodeling in human with congestive heart failure [J]. Chin J Crit Care Med, 2002(5): 268-269.
- [37] Ma X L, Kumar S, Gao F, et al. Inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase decreases cardiomyocyte apoptosis and improves cardiac function after myocardial ischemia and reperfusion [J]. Circulation, 1999, 99(13): 1685-1691.
- [38] Lisman K A, Stetson S J, Koerner M M, et al. The role of inflammation in the pathogenesis of heart failure [J]. Curr Cardiol Rep, 2002, 4(3): 200-205.
- [39] Boffa G M, Zaninotto M, Nalli C, et al. Plasma levels of tumor necrosis factor-alpha correlate with the six-minute walk test results in patients with mild to moderate heart failure [J]. Ital Heart J, 2004, 5(1): 48-52.
- [40] 马斌, 雷贺吉, 韩淑伟. 血清肿瘤坏死因子- α 、白细胞介素-1 β 及白细胞介素-6与慢性心力衰竭病人心功能的相关性分析 [J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2019, 17(16): 2490-2492.
- Ma B, Lei H J, Han S W. Correlation analysis of serum tumour necrosis factor-alpha, interleukin-1 β and interleukin-6 with cardiac function in patients with chronic heart failure [J]. Chin J Integr Med Cardio Cerebrovasc Dis, 2019, 17(16): 2490-2492.
- [41] Kanda T, Takahashi T. Interleukin-6 and cardiovascular diseases [J]. Jpn Heart J, 2004, 45(2): 183-193.
- [42] 陈尉华, 周巍, 曹勤, 等. 米力农对顽固性心衰患者心功能及血清TNF- α 、IL-6、IL-8水平的影响 [J]. 医学临床研究, 2007(9): 1483-1484, 1487.
- Chen W H, Zhou W, Cao Q, et al. Effect of milrinone on heart function and serum level of tumour necrosis factor-alpha, interleukin-6 and 8 with refractory heart failure [J]. J Clin Res, 2007(9): 1483-1484, 1487.
- [43] 嵇莹莹, 龚国清. PI3K/Akt/mTOR通路在炎症相关疾病中分子机制研究进展 [J]. 药学研究, 2018, 37(4): 226-229.
- Ji Y Y, Gong G Q. Progress in molecular mechanism of PI3K/Akt/mTOR pathway in inflammation related diseases [J]. J Pharm Res, 2018, 37(4): 226-229.
- [44] 陈兰英, 尹力, 周滕静, 等. 泽漆醇提取物对LPS诱导小鼠急性肺损伤及其炎症信号通路MAPK/NF- κ B的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(20): 46-51.
- Chen L Y, Yin L, Zhou M J, et al. Effect of *Euphorbia helioscopia* alcohol extract on MAPK/NF- κ B inflammation pathway on mice with acute lung injury induced by LPS [J]. Chin J Exp Tradit Med Form, 2020, 26(20): 46-51.
- [45] 段云娇, 王骏. p38 MAPK信号通路在心力衰竭中作用机制的研究进展 [J]. 中国分子心脏病学杂志, 2019, 19(6): 3160-3164.
- Duan Y J, Wang J. Advances of role of p38 mitogen-activated protein kinases in the development of heart failure [J]. Mol Cardiol China, 2019, 19(6): 3160-3164.