

丹参饮治疗糖尿病心肌病的网络药理学研究

陈亚红, 刘传鑫, 何 涛, 袁付丽, 王文鑫, 田 悦, 刘彦玲, 张 丛, 李正坤, 黄建梅*

北京中医药大学中药学院, 北京 102488

摘要: 目的 通过整合网络药理学和生物信息学方法, 构建活性成分-作用靶点、蛋白-蛋白相互作用 (PPI)、关键靶点相应的生物功能和通路网络, 预测丹参饮治疗糖尿病心肌病的分子作用机制。方法 采用中药系统药理学数据库和分析平台 (TCMSP) 数据库筛选及预测丹参饮的生物活性成分及其潜在作用靶点, 同时检索 PharmGKB 等 4 个数据库挖掘糖尿病心肌病的相关靶点, 对 2 种靶点进行 PPI 网络构建, 交互处理得到丹参饮治疗糖尿病心肌病的关键靶点, 并利用 SystemsDock Web Site 对其进行分子对接验证; 运用 DAVID (Version 6.8) 平台对关键靶点进行 Pathway 分析, 结合 Omicshare 数据库筛选核心通路并利用 Reactome 数据库进行注释。结果 以口服生物利用度 (OB) 和类药性 (DL) 数值作为筛选标准, 从丹参饮中共获得 78 个活性成分, 涉及到 506 个丹参饮治疗糖尿病心肌病的可能靶点, 这些靶点主要富集在磷脂酰肌醇 3-激酶/蛋白激酶 B (PI3K-Akt)、丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 等多条信号通路上。结论 本研究揭示了丹参饮治疗糖尿病心肌病可能的作用机制, 体现了中药复方多成分、多靶点、多途径治疗疾病的特点, 为进一步深入研究其作用机制提供了新思路。

关键词: 网络药理学; 丹参饮; 糖尿病心肌病; 分子对接; 作用靶点

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2019)05-1164-11

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.05.021

Network pharmacology study on Danshen Decoction in treatment of diabetic cardiomyopathy

CHEN Ya-hong, LIU Chuan-xin, HE Tao, YUAN Fu-li, WANG Wen-xin, TIAN Yue, LIU Yan-ling, ZHANG Cong, LI Zheng-kun, HUANG Jian-mei

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

Abstract: Objective Based on the network pharmacology and bioinformatics methods, the networks of active components-targets, protein-protein interactions, and the corresponding biological functions and pathways of key targets were established to predict the molecular mechanism of Danshen Decoction in the treatment of diabetic cardiomyopathy. **Methods** TCMSP database was used to screen and predict the bioactive components of Danshen Decoction and potential targets. Four databases including PharmGKB were searched for related targets of diabetic cardiomyopathy. The PPI network was constructed for the two types of targets. The key targets were obtained by interactive processing and verified by molecular docking by SystemsDock Web Site. Pathway analysis was performed on the key targets using the DAVID platform (Version 6.8), and the core pathway was screened by Omicshare database and annotated by using Reactome database. **Results** Taking oral bioavailability (OB) and drug-like (DL) as screening criteria, 78 active ingredients were screened from Danshen Decoction, involving 506 potential targets for treating of diabetic cardiomyopathy. These targets were mainly rich in PI3K-Akt, MAPK and other signaling pathways. **Conclusion** This study reveals the possible mechanism of Danshen Decoction in the treatment of diabetic cardiomyopathy, embodying the characteristics of multi-component, multi-target and multi-channel of Traditional Chinese Medicine compound, which provides a new idea for further research on its mechanism of action. **Key words:** network pharmacology; Danshen Decoction; diabetic cardiomyopathy; molecular docking; targets

糖尿病心肌病 (diabetic cardiomyopathy, DCM) 作为一种独立的糖尿病并发症, 是以糖尿病为基础疾病的患者, 在排除冠心病、高血压、冠状动脉粥

样硬化等疾病后, 所发生的微血管病变、心肌代谢紊乱和心肌间质增生及纤维化等广泛的心肌功能和结构异常的特异性疾病^[1]。近年来国内外研究表明,

收稿日期: 2018-10-17

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81774014)

作者简介: 陈亚红 (1994—), 女, 2016 级在读硕士生, 研究方向为网络药理学与生物信息学。E-mail: cpu_cyh@163.com

*通信作者 黄建梅 (1970—), 女, 博士, 教授, 博士生导师, 研究方向为中药体内过程分析。E-mail: huangjm@bucm.edu.cn

同龄男性糖尿病患者发生心力衰竭的风险为非糖尿病患者的 2 倍,而同龄女性糖尿病患者出现心力衰竭症状的风险相较于非糖尿病患者高达 5 倍^[2],且在过去的数十年中,糖尿病患者心血管疾病的发病率和病死率仍在持续攀升。然而有关 DCM 的发病机制尚未明确,目前针对 DCM 的治疗方法主要包括生活方式干预、控制血糖和血压及细胞和基因治疗;所涉及到的化学药主要分为他汀类药物、肾素-血管紧张素-醛固酮系统阻滞剂及游离脂肪酸代谢的调节剂。尽管这些药物可在一定程度上缓解患者的临床症状,但鉴于化学药的毒副作用较大且作用靶点较为单一,限制了其在临床的应用与推广。中医在整体观的指导下,通过辨证论治有效提高了患者机体的抗病能力,对 DCM 的发病起到了一定的控制作用,展现了良好的临床效果。

丹参饮是我国传统著名古方,始载于陈修园《时方歌括》卷下,由丹参、檀香、砂仁 3 味中药组成。方中丹参味苦性微寒,归心、肝经,具有活血、祛瘀、止痛之功效;檀香味辛性温,归脾、胃、肺经,为理气要药;砂仁味辛性温,归脾、胃、肾经。后两药温中行气止痛为佐使,辅助丹参共同发挥活血祛瘀、行气止痛之功效。现代药理研究表明^[3],丹参饮具有治疗慢性萎缩性胃炎、原发性贲门失弛缓症、消化性溃疡、肺源性心脏病、心肾阳虚型心力衰竭、冠心病心绞痛等临床用途,尤其在治疗 DCM 方面具有显著优势。但由于心血管疾病的临床病理变化复杂,加之丹参饮的药效物质基础及其药理作用机制尚未明确,因此,系统、整体地研究丹参饮治疗 DCM 的生物活性成分和分子作用机制,有利于为临床用药的创新提供思路借鉴。

网络药理学方法是基于系统生物学理论,通过建立药物与相关靶点、疾病与治疗靶点间的关系预测模型,整合两者间的作用网络,进而分析药物在各网络模块中与特定节点间的相互作用,从系统性、整体性的角度去探究药物与潜在靶点间的作用关系的方法^[4-5]。本研究以网络药理学为切入点,探讨丹参饮治疗 DCM 的有效活性成分和作用靶点,揭示其分子作用机制,对丹参饮科学内涵的阐释以及临床推广具有重要意义。

1 方法

1.1 丹参饮化学成分收集

运用中药系统药理学数据库和分析平台(TCMSP)检索丹参饮中各单味药化学成分,构建

成分数据库。根据研究结果,以其吸收、分布、代谢、排泄(ADME)参数中的口服生物利用度(oral bioavailability, OB) $\geq 30\%$ 、类药性(Drug-likeness, DL) ≥ 0.18 为限制条件进行筛选,得到丹参饮的生物活性成分。

1.2 成分对应靶点库和 DCM 相关靶点库的构建

通过 TCMSP 数据库、STITCH 数据库(<http://stitch.embl.de/>, V4.0)检索丹参饮中各单味药化学成分靶点,检索条件中物种设置为“Homo sapiens”且置信度大于 0.4,剔除没有相关信息的化学成分。

设置检索词“Diabetic cardiomyopathy”,对人类孟德尔遗传数据库 OMIM(<http://omim.org/>)、TTD 数据库(<http://biddnus.edu.sg>)、PharmGKB 数据库(<http://www.pharmgkb.org>)、CTD 数据库(<http://ctdbase.org/>)进行检索,汇总结果,去重、取并集后,即为相关 DCM 靶点库。

1.3 丹参饮“活性成分-靶点网络”的构建

Cytoscape 软件(Version 3.6.1)是一款图形化显示网络并进行分析和编辑的软件,将筛选出的丹参饮的活性成分及其靶点导入其中,构建丹参饮“活性成分-靶点网络”。网络图中“节点(node)”代表丹参饮中的活性成分和作用靶点,“边(edge)”代表活性成分和作用靶点间的相互关系。采用 Cytoscape 软件中的相关分析程序,对丹参饮中生物活性成分和作用靶点特征进行分析,明确网络中较为重要的节点。查阅文献并分析重要节点间的相互作用。

1.4 交互网络的构建和分析

将成分对应靶点库与 DCM 相关靶点库分别导入 Cytoscape 软件(Version 3.6.1)的 BisoGenet 插件中,分别做蛋白质-蛋白质相互作用关系(protein-protein interaction, PPI)图并进行交互处理。采用 CytoNCA 插件对以上结果进行拓扑学参数分析和筛选。重要靶点用度中心性(degree centrality, DC)、接近中心性(closeness centrality, CC)及介度中心性(betweenness centrality, BC) 3 个参数来评价,筛选标准为 DC 大于 2 倍中位数、CC 及 BC 分别大于 1 倍中位数。在重要靶点中筛选与成分、DCM 均直接相关的靶点为关键靶点。

1.5 分子对接验证

利用 RCSB PDB(<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>)数据库检索并下载关键靶蛋白的 3D 结构文件,同时利用 PubChem 数据库下载活性化合物的 3D 结构文件,将二者共同导入 SystemsDock 在线平

台进行分子对接验证。

1.6 Gene ontology (GO) 生物功能过程和 KEGG 代谢通路富集分析

Pathway 分析能够显示蛋白质相互关系网络中的不同信号通路的重要性程度,本研究利用 DAVID (Version 6.8) 平台对重要靶点进行 Pathway 分析,结合 Omicshare 数据库筛选核心通路,将结果以气泡图形式呈现,并根据富集因子值分析核心通路富集程度,以探究丹参饮治疗 DCM 可能的作用机制。其中,节点的大小表示富集到的靶点数量,节点的颜色由红色至绿色表明 P 值由小到大,因此红色节点越大信号通路的显著性就越高,说明该条信号通路的重要性越高。同时利用 Reactome 数据库对筛选到的核心通路加以注释。

2 结果

2.1 丹参饮成分的筛选

本研究通过 TCMSP 数据库对丹参饮中 3 味中药已报道成分和 ADME 参数进行检索,得到成分结果为丹参 202 个、砂仁 165 个、檀香 70 个,去掉重复分子,共收集到 437 个成分。以 $OB \geq 30\%$ 和 $DL \geq 0.18$ 为指标对丹参饮入血活性成分进行初步筛选,共得到 78 个生物活性成分。STITCH 数据库中选择置信度 > 0.4 ,剔除不含相关信息的化学成分后,同时通过文献检索对活性成分进行补充,对于虽不满足 ADME 参数但成分含量较高且药理作用明确的化学成分也作为候选活性成分,最终筛选得到对应靶点的生物活性成分共 27 个,具体信息见表 1。

表 1 丹参饮中候选活性成分

Table 1 Candidate active components in Danshen Decoction

编号	PubChem CID	化合物	分子式	药材来源	筛选依据
1	160142	丹参新酮 (miltirone)	C ₁₉ H ₂₂ O ₂	丹参	$OB \geq 30\%$ 、 $DL \geq 0.18$
2	6918234	丹参酚酸 B 甲酯 (magnesium lithospermate B)	C ₃₆ H ₂₈ MgO ₁₆	丹参	抗炎、抗氧化、抗动脉粥样硬化 ^[6]
3	11600642	丹参素 (danshensu)	C ₉ H ₁₀ O ₅	丹参	符合 Lipinski 类药 5 原则
4	2518	咖啡酸 (caffeic acid)	C ₉ H ₈ O ₄	丹参	抗氧化、降血压、预防心脑血管疾病 ^[7]
5	149138	丹参酮 VI (tanshinone VI)	C ₁₈ H ₁₆ O ₄	丹参	$OB \geq 30\%$ 、 $DL \geq 0.18$
6	164676	丹参酮 II _A (tanshinone II _A)	C ₁₉ H ₁₈ O ₃	丹参	$OB \geq 30\%$ 、 $DL \geq 0.18$
7	457801	γ -谷甾醇 (γ -sitosterol)	C ₂₉ H ₅₀ O	丹参	$OB \geq 30\%$ 、 $DL \geq 0.18$, 降低胆固醇 ^[8]
8	73400	山豆根碱 (dauricine)	C ₃₈ H ₄₄ N ₂ O ₆	丹参	抗氧化、抗炎、对脑缺血再灌注损伤有保护作用 ^[9]
9	368	对称蒿精 (sym-homospermidine)	C ₈ H ₂₁ N ₃	檀香	符合 Lipinski 类药 5 原则
10	6429302	α -反-香柠檬烯 (<i>trans</i> - α -bergamotene)	C ₁₅ H ₂₄	檀香	檀香挥发油成分 ^[10]
11	440015	顺式-4-羟基脯氨酸 (<i>cis</i> -4-hydroxyproline)	C ₅ H ₉ NO ₃	檀香	抗氧化 ^[11]
12	5810	反式-4-羟基脯氨酸 (<i>trans</i> -4-hydroxyproline)	C ₅ H ₉ NO ₃	檀香	抗氧化、抗辐射、抗菌、抗肿瘤、抗高血压 ^[12]
13	10720	檀烯 (santene)	C ₉ H ₁₄	檀香	抗肿瘤 ^[13]
14	643820	橙花醇 (nerol)	C ₁₀ H ₁₈ O	砂仁	抗氧化、抗炎、抑制细胞凋亡 ^[13]
15	102667	松香芹醇 (pinocarveol)	C ₁₀ H ₁₆ O	砂仁	抗氧化 ^[14]
16	6616	茨烯 (camphene)	C ₁₀ H ₁₆	砂仁	抗菌、抗高血脂 ^[15]
17	6436348	吉马酮 (germacrone)	C ₁₅ H ₂₂ O	砂仁	抑制癌细胞增殖、抗癌 ^[16]
18	2537	樟脑 (camphor)	C ₁₀ H ₁₆ O	砂仁	含量高, 杀虫、抗氧化 ^[17]
19	1140	甲苯 (methylbenzol)	C ₇ H ₈	砂仁	抗氧化 ^[18]
20	11230	4-萜品醇 (terpinene-4-ol)	C ₁₀ H ₁₈ O	砂仁	含量高, 入血成分 ^[19]
21	7438	香芹醇 (carveol)	C ₁₀ H ₁₆ O	砂仁	杀虫, 延长异丙酚诱导的麻醉 ^[20]
22	3026	邻苯二甲酸二甲酯 (dibutyl phthalate)	C ₁₆ H ₂₂ O ₄	砂仁	抗雄激素、抗氧化 ^[21]
23	22311	柠檬烯 (limonene)	C ₁₀ H ₁₆	砂仁	含量高 ^[8]
24	6654	α -蒎烯 (α -pinene)	C ₁₀ H ₁₆	砂仁	含量高, 抗菌、抗氧化 ^[21]
25	439570	香芹酮 (<i>L</i> -carvone)	C ₁₀ H ₁₄ O	砂仁	抗焦虑、杀虫 ^[20]
26	6549	芳樟醇 (linalool)	C ₁₀ H ₁₈ O	砂仁	抗增殖、抗胆碱能作用 ^[16]
27	5284507	橙花叔醇 (nerolidol)	C ₁₅ H ₂₆ O	砂仁	抗氧化、神经保护作用 ^[20]

2.2 DCM 相关靶点的检索

通过检索 TTD、OMIM、CTD、PharmGKB 数据库得到 DCM 相关作用靶点, 分别检索到 17、8、212 和 10 个靶点。删去重复靶点, 共得到 217 个 DCM 相关作用靶点。

2.3 治疗 DCM 的丹参饮成分的关键靶点筛选及网络构建

经 TCMSP 数据库、STITCH 数据库筛选, 共获得丹参饮成分对应靶点 717 个, DCM 相关靶点 217 个, 分别作 PPI 图并进行交互处理。对丹参饮“成分-靶点 PPI 图”和“疾病-靶点 PPI 图”的 4 154 个交集靶点进行拓扑参数分析, DC、CC、BC 的中位数值分别为 30、0.434 32、0.000 39。选择 $DC > 60$ 、 $CC > 0.434\ 32$ 、 $BC > 0.000\ 39$ 的靶点作为丹参饮治疗 DCM 的重要靶点, 共 506 个 (图 1)。按 DC 排序, 选取其中 2 个关键靶点, 分别为表皮生长因子受体 (EGFR) 和淀粉样前体蛋白 (APP), 见表 2。

2.4 分子对接验证

基于“2.3”项下的筛选结果, 本研究采用分子对接方法对上述 2 个关键靶点 EGFR 和 APP 进行验证。将其 PDB ID 分别导入 SystemsDock 中, 与丹参饮的 27 个生物活性成分进行对接, 对接结果见表 3。分析对接结果可知, docking score 大于 7.0 的成分有 2 个 (5.6%), 7.0~5.0 的成分有 16 个 (44.4%), 5.0~4.25 的成分有 14 个 (38.9%), 小于 4.25 的成分有 4 个 (11.1%)。通常情况下, docking score 大于 7.0 表明药物分子与靶点具有强烈的结合活性, 大于 5.0 表明药物分子与靶点具有较好的结合活性, 大于 4.25 表明药物分子与靶点具有一定的结合活性。由此可知, 丹参饮的生物活性成分与 2 个关键靶点具有较好的结合活性, 且多数成分与 EGFR 蛋白分子对接匹配度大于 APP 蛋白分子对接匹配度。此外, 在 Pathway 分析中磷脂酰肌醇 3-激酶/蛋白激酶 B (PI3K/Akt) 信号通路排名也在核转录因子- κ B (NF- κ B) 信号通路之前, 该结果也间接表明分子对接结果与网络药理学筛选结果相一致, 进一步验证了网络药理学预测靶点的可靠性。

2.5 丹参饮治疗 DCM 的核心通路筛选

通过 DAVID (Version 6.8) 平台对上述 506 个重要靶点进行 Pathway 分析, 将结果分别导入 Omicshare 数据库、Reactome 数据库, 实现对用于治疗 DCM 的丹参饮成分的核心通路的筛选及注

释, 并作图 (图 2、3 和表 4)。图 2 表明丹参饮的作用靶点主要涉及细胞周期、免疫系统、信号转导、基因表达、DNA 复制等多个生物过程, 这体现出丹参饮通过调控多个复杂的生物过程来治疗 DCM, 其中黄色至棕色线条代表重要靶点富集的通路, 且 P 值随黄色至棕色逐渐增大。图 3 显示了丹参饮作用靶点的 Pathway 分析结果, 排除广泛通路后, 表 4 中列出了排名前 20 位的信号转导通路。经分析, 506 个重要靶点主要分布在 PI3K-Akt、丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK)、表皮生长因子受体 (ErbB)、腺苷酸活化蛋白激酶 (AMPK)、丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 (mTOR)、转化生长因子- β (TGF- β)、NF- κ B、Wnt、Notch 等多条信号通路中, 这提示丹参饮通过作用于多条通路来治疗 DCM 且这些通路间存在着复杂的相互作用关系。

3 讨论

DCM 是糖尿病最重要的一种远期并发症, 包括糖尿病心肌病变、心脏植物神经功能紊乱及心脏微血管和大血管病变^[22]。西医通过细胞生物学研究, 提出了“共同土壤”学说, 将 DCM 的发病机制主要归为以下 4 个方面: (1) 心肌纤维化。心肌纤维化是 DCM 组织形态学方面的主要表现之一, 最终表现为心室舒张功能衰竭, 心肌僵硬, 冠状动脉血流储备下降, 严重时可诱发猝死。(2) 心肌糖脂代谢紊乱。在 DCM 中, 葡萄糖氧化利用率逐渐降低, 脂肪酸摄取量不断增加, 造成大量的游离脂肪酸堆积, 同时抑制了糖代谢途径, 最终导致心肌细胞出现凋亡坏死, 能量代谢紊乱。(3) 氧化应激和炎症反应。在病理状态下, 机体内的活性氧 (ROS) 增多, 进而促进血管内皮细胞增殖, 炎性细胞因子表达增加, 从而导致心血管病变。(4) Ca^{2+} 调节异常。尽管中医学中没有 DCM 这一病名, 但其相当于中医学“消渴”并发“心悸”“胸痹”“真心痛”等范畴^[23]。DCM 为本虚标实之证, 心脉痹阻、痰瘀互结、气阴两虚为其主要病机, 活血通络、益气养阴等治疗方法多为临床采用。中医中药在预防和诊治 DCM 方面已取得一定的成果, 展现出独特的优势, 具有广阔的发展前景。

丹参饮是治疗冠心病血瘀证的经典方剂, 由丹参、檀香、砂仁 3 味药组成, 药少力专, 共奏化瘀行气止痛之功效。《医学三字经》评价其“治心胸诸痛神验…”, 临床上常用于治疗心脉痹阻、气滞血瘀所致的胸痹、心悸、心痛等症状。现代药理研究表

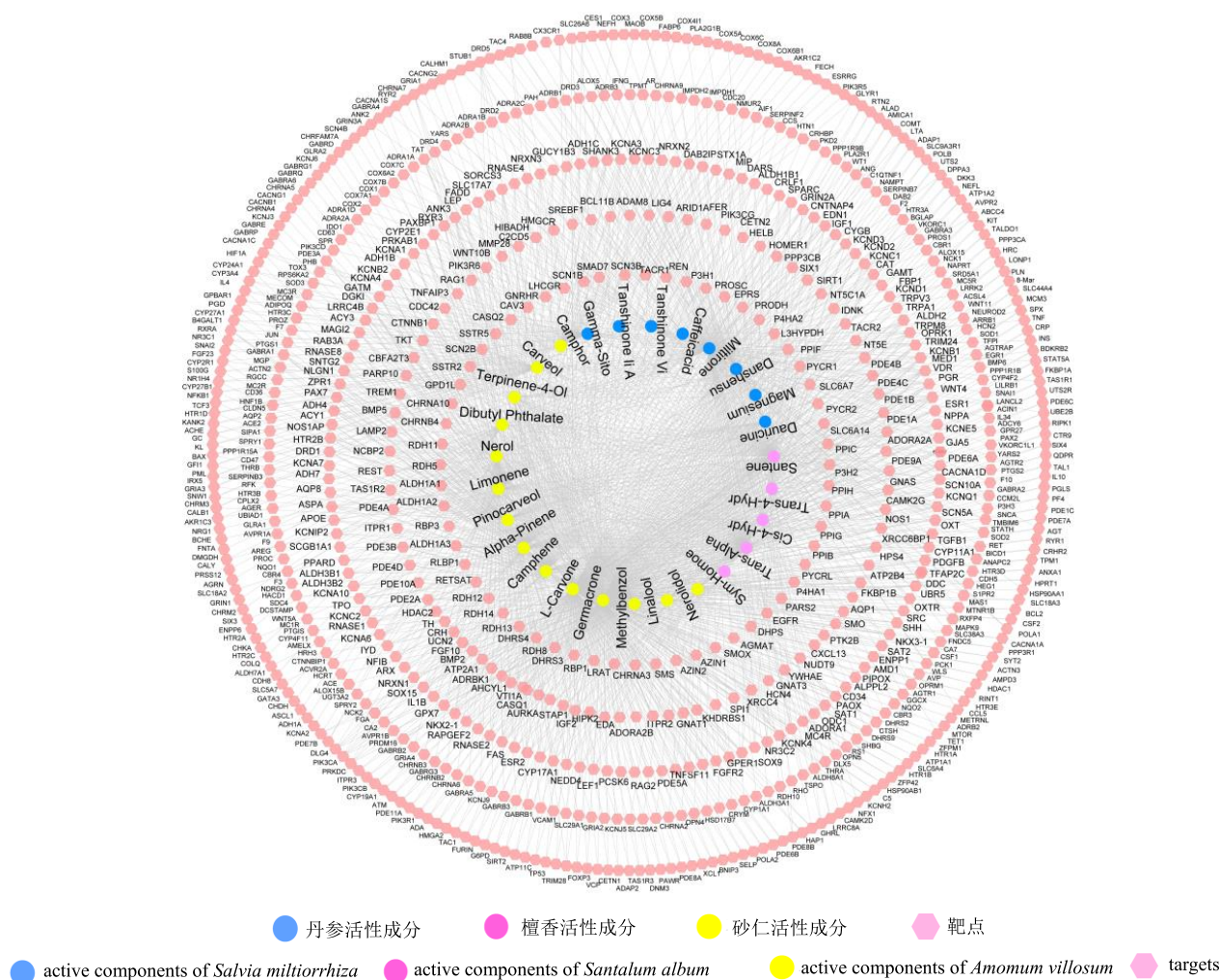


图 1 丹参饮活性成分-靶点网络 (A) 及丹参饮治疗 DCM 的关键靶点筛选 (B)

Fig. 1 Bioactive components-targets network of Danshen Decoction (A) and screening of key targets for ingredients of Danshen Decoction for treatment of DCM (B)

表 2 丹参饮相互作用关键靶点

Table 2 Important interaction targets of Danshen Decoction

排序	Uniprot ID	靶蛋白名称	靶基因名称	度中心性	介度中心性	接近中心性
1	P00533	epidermal growth factor receptor	EGFR	942	0.074 335	0.547 312
2	P05067	amyloid-beta A4 protein	APP	677	0.042 795	0.528 237

表 3 丹参饮活性成分分子对接结果

Table 3 Molecular docking results of active components of Danshen Decoction

活性成分	靶蛋白	PDB ID	docking scores	活性成分	靶蛋白	PDB ID	docking scores
吉马酮	EGFR	5UGB	5.996	香芹酮	EGFR	5UGB	5.525
	APP	1X11	5.773		APP	1X11	4.742
橙花叔醇	EGFR	5UGB	6.336	丹参酚酸 B 甲酯	EGFR	5UGB	7.870
	APP	1X11	4.432	α -反-香柠檬烯	APP	1X11	4.280
松香芹醇	EGFR	5UGB	4.783	γ -谷甾醇	EGFR	5UGB	7.363
	APP	1X11	4.525	橙花醇	APP	1X11	3.865
邻苯二甲酸二甲酯	EGFR	5UGB	5.402	丹参新酮	EGFR	5UGB	6.364
	APP	1X11	3.715	顺式-4-羟基脯氨酸	APP	1X11	5.014
4-萜品醇	EGFR	5UGB	4.712	丹参酮 II _A	EGFR	5UGB	5.908
	APP	1X11	5.530	檀烯	APP	1X11	5.173
香芹醇	EGFR	5UGB	5.497	丹参酮 VI	EGFR	5UGB	4.783
	APP	1X11	4.797	芳樟醇	APP	1X11	3.764
α -蒎烯	EGFR	5UGB	5.161	山豆根碱	EGFR	5UGB	4.627
	APP	1X11	4.872	反式-4-羟基脯氨酸	APP	1X11	5.299
茨烯	EGFR	5UGB	4.727	丹参素	EGFR	5UGB	4.588
	APP	1X11	5.149	甲苯	APP	1X11	5.700
樟脑	EGFR	5UGB	5.540	咖啡酸	EGFR	5UGB	3.976
	APP	1X11	4.904	对称蒿精	APP	1X11	4.362

明,丹参饮通过促进胰岛素分泌而起到降血糖作用,此外还具有抗心肌纤维化、保护心肌细胞和心脏超微结构、降低耗氧量以及血液黏度、显著增加冠状动脉血流量、促进红细胞再生等诸多功效。生脉散合丹参饮加减方能够有效调节糖代谢,通过促进胰岛素分泌而有效控制血糖,同时在改善心脏功能、抗心肌缺血、缓解心绞痛等方面也发挥了一定的疗效,对 DCM 患者有显著而长远的治疗作用^[24]。其中,丹参具有凉血消痛的药理作用特点,可以抑制心肌肥厚,清除 ROS 而抗脂质过氧化,增加心肌收缩力,同时能够增加冠状动脉血流量,改善心肌糖脂代谢紊乱以及降低血糖^[25-28]。其主要活性成分包括脂溶性和水溶性成分。脂溶性成分有隐丹参酮、丹参酮、丹参酮 II_A 等;水溶性成分有丹参素、紫草酸、丹酚酸(A、B、C、D、E、F、G)、原儿茶醛和迷迭香酸等^[29]。有研究表明,丹参酮 II_A 磺酸钠能够降低糖尿病大鼠血清中乳酸脱氢酶、心肌肌钙蛋白 I 和肌酸激酶的含量,可以显著降低糖尿病大鼠心肌和血清中的丙二醛含量,增加巯基、一氧化氮(NO)含量,同时增强总抗氧化能力,发挥对糖尿病大鼠心肌的保护作用^[30]。丹酚酸 B 能够通过上调过氧化物酶体增殖物激活受体- α (PPAR- α) 表达,改善胰岛素抵抗,抑制 2 型糖尿病小鼠心肌肥厚。通过抑制 Cu²⁺氧化低密度脂蛋白(LDL),使

主动脉内皮细胞上的氧化修饰的低密度脂蛋白(ox-LDL)及 ROS 的产生减少,进一步阻止动脉壁上的脂质堆积,从而有效避免了心肌细胞凋亡等病变^[31]。此外,丹参酮类化合物如丹参酮 II_A、隐丹参酮等可通过抑制炎症细胞因子肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)、IL-6 的生成及 NF- κ B 的表达而发挥良好的抗炎作用。丹参素通过减轻高糖诱导下心肌细胞的氧化应激损伤,降低炎症因子和凋亡基因的表达,从而对心肌细胞起到保护作用^[32]。檀香可以促进肠道蠕动,其主要成分是檀香油,其中倍半萜类化合物 α -檀香烯和 β -檀香醇约占 90%以上,对中枢神经系统具有镇静作用^[33]。有文献报道,益气活血中药(有效组分为丹参酮 II_A、檀香油等)能够改善 DCM 大鼠的一般情况、体质量、血糖及心肌组织结构,抑制 DCM 大鼠的心肌细胞凋亡^[34]。砂仁具有降低血液黏度、改善微循环等药理作用^[35]。研究表明,反式橙花叔醇、丹参素钠、黄芪甲苷和人参皂苷 Rg₁ 的低浓度组合给药能协同增强抗心肌细胞缺氧损伤作用,并且能够抑制脂多糖诱导分泌的 NO,发挥抗炎作用^[36]。这提示丹参饮活性成分的筛选具有一定的依据。

本研究经初步筛选得到 78 个丹参饮中的生物活性成分,剔除没有相关信息的成分后最终获得 27 个生物活性成分,对应成分靶点 717 个,涉及到 104 956

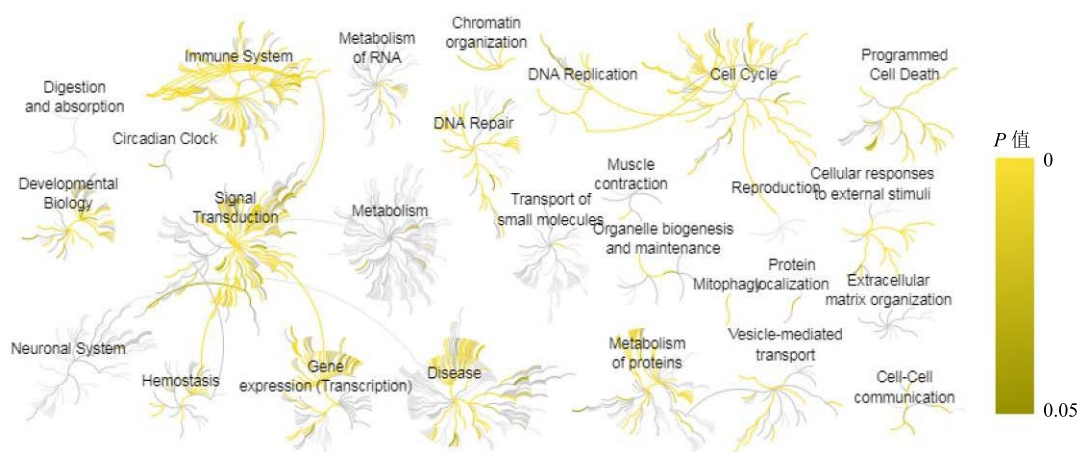


图 2 用于治疗 DCM 的丹参饮活性成分作用靶点的生物功能分析

Fig. 2 Biological function analysis of key targets for active ingredients of Danshen Decoction for treatment of DCM

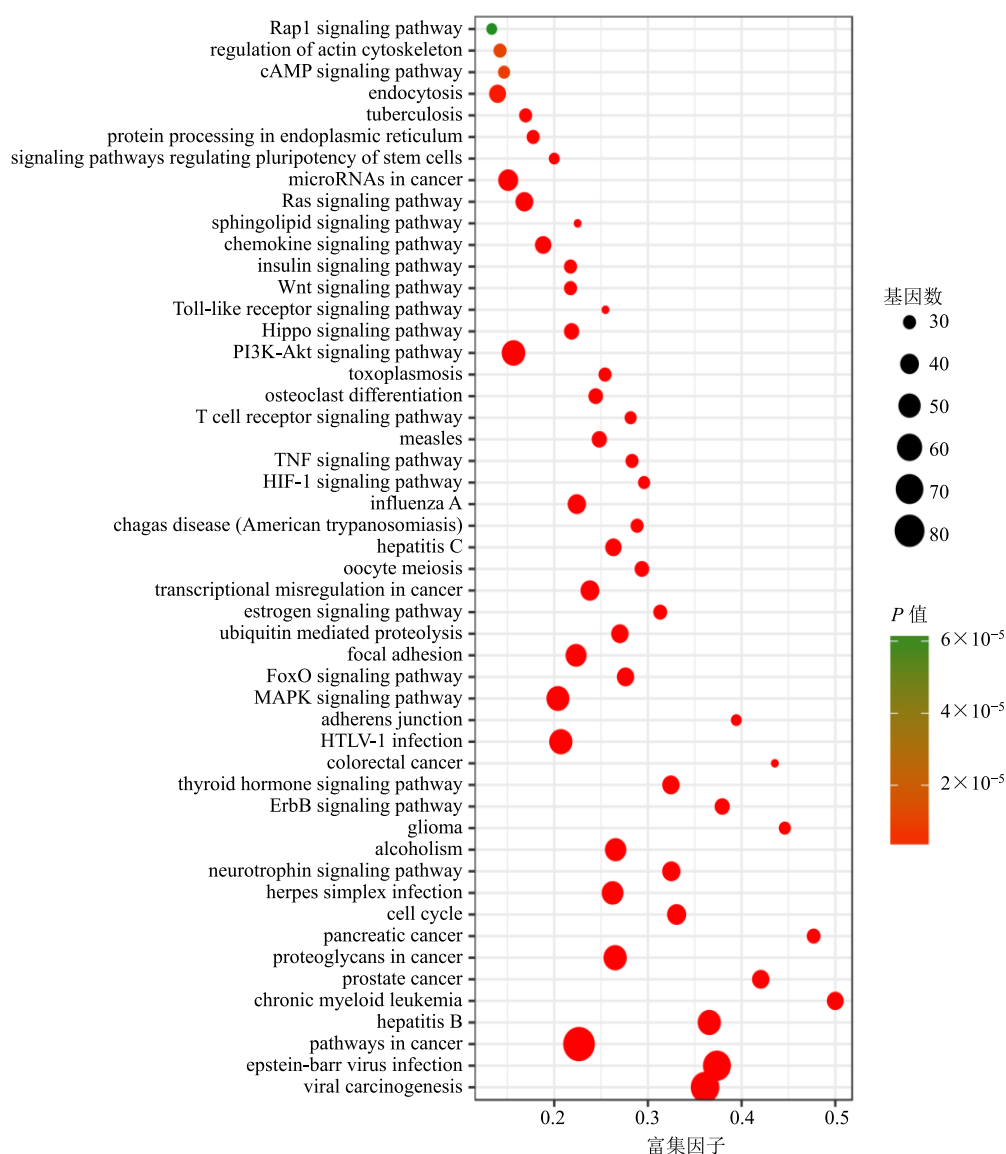


图 3 丹参治疗 DCM 作用靶点 KEGG 富集气泡图

Fig. 3 Bubble diagram of KEGG enrichment of key targets for Danshen Decoction for treatment of DCM

表 4 靶点通路富集结果 (前 20 位)
Table 4 Enrichment results of key targets (Top 20)

编号	通路名称	靶点命中数量	P 值
hsa04151	PI3K-Akt signaling pathway	54	2.08×10^{-11}
hsa04010	MAPK signaling pathway	52	1.11×10^{-15}
hsa04310	Wnt signaling pathway	38	6.72×10^{-10}
hsa04064	NF-kappa B signaling pathway	37	2.13×10^{-9}
hsa04152	AMPK signaling pathway	33	1.60×10^{-3}
hsa04370	VEGF signaling pathway	31	5.79×10^{-10}
hsa04350	TGF-beta signaling pathway	30	9.33×10^{-7}
hsa04622	RIG-I-like receptor signaling pathway	30	2.81×10^{-7}
hsa04630	Jak-STAT signaling pathway	30	3.92×10^{-2}
hsa04150	mTOR signaling pathway	27	8.97×10^{-5}
hsa04330	notch signaling pathway	25	1.44×10^{-3}
hsa04012	ErbB signaling pathway	23	1.98×10^{-18}
hsa04014	ras signaling pathway	23	4.85×10^{-9}
hsa04068	FoxO signaling pathway	20	1.60×10^{-15}
hsa04910	insulin signaling pathway	19	2.08×10^{-11}
hsa04668	TNF signaling pathway	18	1.11×10^{-15}
hsa04620	Toll-like receptor signaling pathway	17	6.72×10^{-10}
hsa04915	estrogen signaling pathway	15	2.13×10^{-9}
hsa04662	B cell receptor signaling pathway	13	1.60×10^{-3}
hsa04022	cGMP-PKG signaling pathway	10	5.79×10^{-10}

个相互作用关系。从“活性成分-作用靶点网络图”中可以看到,有效成分丹参素、丹参新酮、橙花醇、松香芹醇、樟脑萜、檀烯等可以调控 DRD1、TH 等靶点,而 HTR1A、AVP、HTR1B 能被不止 1 个活性成分所调控,这表明多个靶点能够被多个活性成分调控,体现出丹参饮治疗 DCM 的相互协调、共同调节的作用机制。PPI 网络图显示靶点间存在多种相互作用,共同构成一个复杂的生物网络体系,网络中连接度越大,表明丹参饮通过该靶点治疗 DCM 的可能性越大。在相互作用网络中按照 DC 排名筛选出了 2 个关键靶点 EGFR 和 APP,分子对接结果显示丹参饮生物活性成分能够与关键靶点较好地结合,有研究分别通过 Masson 染色和 Western blotting 方法观察到 DCM 大鼠的心肌胶原组织出现显著增生,EGFR 蛋白表达水平显著升高,推测为长期糖尿病导致体内微环境失衡,激活 EGFR 与其配体结合,同时启动了相关信号通路的级联反应,进而促进了 DCM 心肌纤维化的发生^[37]。文献研究及网络药理学结果共同提示,EGFR 可能为丹参饮治疗 DCM 的关键靶点,同时也间接说明网络药理学预测靶点的准确性。

DAVID (Version 6.8) Pathway 分析和 Reactome 通路注释分析结果显示,丹参饮治疗 DCM 的潜在

作用机制多集中在抗氧化应激和抗炎作用(图 5),与氧化应激相关的信号通路有 AMPK 信号通路等;与炎症反应相关的信号通路包括 PI3K-Akt、Wnt、TGF- β 、TNF 等;与二者均密切相关的信号通路包括 NF- κ B、MAPK 信号通路。PI3K-Akt 信号通路广泛分布于各种细胞中,通过能量代谢、调节细胞周期及蛋白质合成等途径,在心肌炎症反应、心力衰竭及心肌肥大的发展过程中发挥着重要作用^[38]。机体内许多信号分子可以激活 PI3K,活化后的 PI3K 诱导第二信使激活 PIP3,后者能够磷酸化 Akt 蛋白上的 Thr308 位点,进而激活 Akt。活化后的 Akt,通过调控其下游靶蛋白哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)、NF- κ B、葡萄糖转运蛋白-4 (GLUT-4)等,进一步调控细胞内多种生命活动。在缺血/再灌注损伤的大鼠模型中,PI3K-Akt 信号通路相关蛋白的表达水平显著提高,心肌细胞的凋亡程度显著降低。孙晓慧等^[39]发现在 DCM 大鼠心肌中,Sirt1 表达水平升高,PI3K-Akt/mTOR 信号通路被抑制,这提示 Sirt1 通过抑制 PI3K-Akt/mTOR 信号通路,继而诱导 DCM 的发生发展。丹参饮可能通过抑制 PKB/Akt 通路,激活过氧化物酶体增殖活化受体 γ 辅助活化因子-1 α (PGC-1 α),使其与 p65 亚基的相互作用增强,从而下调了 NF- κ B 的活性,起到抗炎

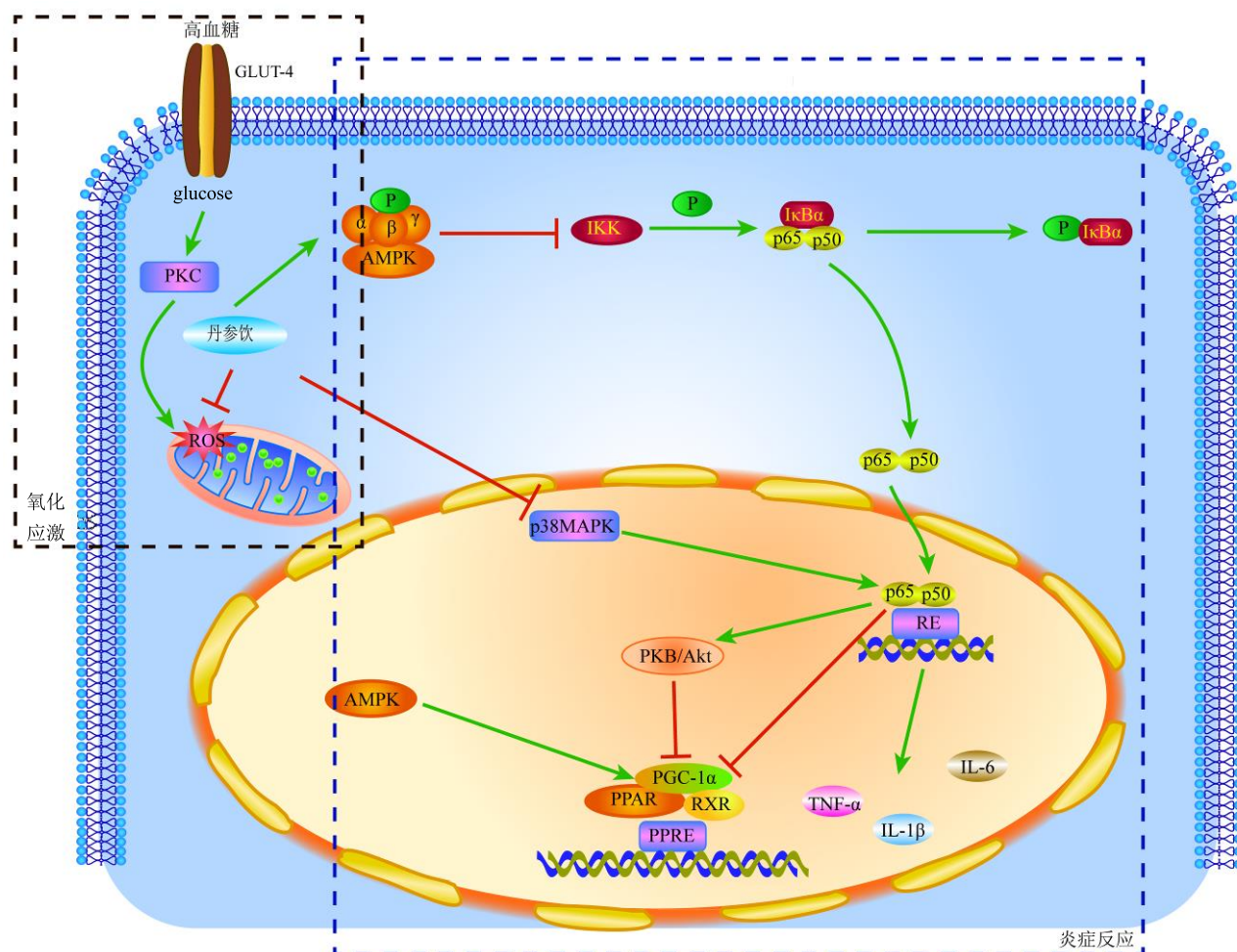


图 5 丹参饮治疗 DCM 的潜在作用机制

Fig. 5 Potential mechanisms of Danshen Decoction for treatment of DCM

作用。MAPK 信号通路涉及到多级蛋白激酶的级联反应,包括细胞外信号调节激酶(ERK)、c-Jun 氨基末端激酶(JNK)和 p38 丝裂原活化蛋白激酶(p38MAPK),并且这些蛋白激酶都与糖尿病并发症有关^[40]。高糖环境下增加了大鼠心肌细胞中蛋白激酶 C(PKC)的表达,进而使 MAPK、ROS、NF-κB 的表达量有所上调。其中,ROS 是 DCM 发生发展的主要推动者。丹参饮可以抑制 ROS 的产生及氧化应激反应,从而发挥抗氧化的保护作用。有研究证实 p38 抑制剂可抑制高糖高脂诱导的 NO、IL-6、ROS、3-硝基酪氨酸(3-NT)、IL-β 水平的提高,这提示 p38MAPK 是介导高糖高脂导致 DCM 病理过程中发生炎症反应的重要影响因素^[41]。Wnt 信号通路广泛存在于各种生物体中,其参与了肿瘤的形成、心肌梗死、糖尿病的发生等病理变化过程,与调控细胞生长发育及分化密切相关,近年来在心血管疾

病中的研究较为深入。有研究指出,DCM 大鼠心肌中的 Wnt2、β-catenin 及 c-Myc 的表达随着 DCM 的病理发展进程呈现出不同程度的增加趋势,这提示 DCM 诱导的 Wnt 信号通路被激活^[42]。丹参饮可能通过抑制 Wnt 信号通路及下游靶基因 c-Myc 的表达来防治 DCM。NF-κB 信号通路作为糖尿病血管并发症的发病机制中多数信号通路的重要中间环节,其激活与糖尿病心血管疾病的发展进程有紧密联系。在高糖状态下,NF-κB 活化后可以产生大量炎症介质进而引发炎症反应,同时激活 NF-κB 信号通路的级联反应,最终扩大心肌的局部损伤。研究表明,丹参酮 II_A 可通过抑制 NF-κB 信号通路的激活进而减少 TNF-α mRNA 在 DCM 大鼠心肌细胞中的表达,减轻 DCM 大鼠心肌组织的炎症反应及纤维化程度,进而起到对心肌细胞的保护作用^[43]。AMPK 被称作“细胞的代谢感受器”,其活性在 ATP

减少或是 AMP/ATP 比值升高的情况下增强。有研究表明,当心肌细胞中 AMPK 活性降低时,可引发还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(NADPH)氧化酶来源的 ROS 增多,进而导致心肌细胞损伤并引发 DCM^[39]。丹参饮可以激活 AMPK,抑制 NF- κ B 的级联反应,从而起到抗炎和抗氧化作用,并改善 DCM 的心脏损伤。此外, Jak-信号转导与转录活化因子(STAT)信号通路 with DCM 心肌细胞肥厚的发病机制关系较为密切,具有活血化瘀的中药可以通过下调 Jak2、STAT3 mRNA 及蛋白的表达水平,抑制 Jak-STAT 信号通路,防治心肌细胞肥大^[44]。mTOR 信号通路是细胞自噬的关键信号通路之一,与众多心血管疾病的发生密切相关。在正常情况下,细胞自噬有益于心肌细胞的保护作用,自噬过度或不足则会影响 DCM 的病程。丹参饮可能通过抑制 mTOR 信号通路而发挥作用。FoxO 蛋白一般位于细胞核内,能够调节多种周期蛋白的表达,当其增多时可引发细胞凋亡,丹参饮可能通过抑制 FoxO 信号通路而发挥作用^[45]。

总之,DCM 是以结构和功能改变为特征的多因素疾病,目前已有越来越多的临床前研究发现了治疗 DCM 的新靶点,并证实作用于这些潜在疾病靶点的中药将对 DCM 的防治起到重要作用。本研究通过整合生物信息学和网络药理学方法,对丹参饮治疗 DCM 的主要生物活性成分及其药理作用机制进行了分析,同时采用分子对接方法对其生物活性成分与关键靶点的结合能力进行验证,间接证实了网络药理学预测靶点的可靠性与准确性。由活性成分-作用靶点网络图和通路分析可知,丹参饮通过丹参素、丹参新酮、橙花醇等多个化学成分共同作用于 EGFR 蛋白,涉及到与炎症及氧化应激相关的 PI3K-Akt、MAPK、Wnt、NF- κ B、AMPK 等多条信号通路,体现了中药复方多成分、多靶点、多途径治疗疾病的特点,为发病机制复杂的 DCM 的治疗提供了思路借鉴。

参考文献

- [1] Inki K, Xu W J, Reed J C. Cell death and endoplasmic reticulum stress: Disease relevance and therapeutic opportunities [J]. *Nat Rev Drug Dis*, 2008, 7(12): 1013-1030.
- [2] Kannel W B, McGee D L. Diabetes and cardiovascular disease. The Framingham study [J]. *JAMA*, 1979, 241(19): 2035-2038.
- [3] 赵富花,刘永刚,何进来. 丹参饮的临床新用途 [J]. 时珍国医国药, 2005, 16(2): 160-161.
- [4] 程肖蕊,周文霞,张永祥. 网络药理学实验研究相关技术 [J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2012, 26(2): 131-137.
- [5] Zhang Y Q, Mao X, Guo Q Y, *et al.* Network pharmacology-based approaches capture essence of Chinese herbal medicines [J]. *Chin Herb Med*, 2016, 8(2): 107-116.
- [6] Hur K Y, Kim S H, Choi M, *et al.* Protective effects of magnesium lithospermate B against diabetic atherosclerosis via Nrf2-ARE-NQO1 transcriptional pathway [J]. *Atherosclerosis*, 2010, 211(1): 69-76.
- [7] Qu J, Ren X, Hou R Y, *et al.* The protective effect of magnesium lithospermate B against glucose-induced intracellular oxidative damage [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011, 411(1): 32-39.
- [8] Abourashed E A, El-Alfy A T. Chemical diversity and pharmacological significance of the secondary metabolites of nutmeg (*Myristica fragrans* Houtt.) [J]. *Phytochem Rev Proceed Phytochem Soc Eur*, 2016, doi: 10.1007/s11101-016-9469-x.
- [9] Vinothkumar V, Manoharan S, Nirmal M R, *et al.* Geraniol modulates cell proliferation, apoptosis, inflammation, and angiogenesis during 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-induced hamster buccal pouch carcinogenesis [J]. *Mol Cell Biochem*, 2012, 369(1/2): 17-25.
- [10] El-Ghorab A H, Nauman M, Anjum F M. A comparative study on chemical composition and antioxidant activity of ginger (*Zingiber officinale*) and cumin (*Cuminum cyminum*) [J]. *J Agric Food Chem*, 2010, 58(14): 8231-8237.
- [11] Kim J H, Lee H J, Jeong S J, *et al.* Essential oil of *Pinus koraiensis* leaves exerts antihyperlipidemic effects via up-regulation of low-density lipoprotein receptor and inhibition of acyl-coenzyme A: Cholesterol acyltransferase [J]. *Phytother Res*, 2012, 26(9): 1314-1319.
- [12] Zhong Z, Chen X, Tan W, *et al.* Germacrone inhibits the proliferation of breast cancer cell lines by inducing cell cycle arrest and promoting apoptosis [J]. *Eur J Pharmacol*, 2011, 667(1): 50-55.
- [13] Barrero A F, Herrador M M, del Moral J F Q, *et al.* Efficient synthesis of the anticancer β -elemene and other bioactive elemenes from sustainable germacrone [J]. *Org Biomol Chem*, 2011, 9(4): 1118-1125.
- [14] Liu Z L, Zhao N N, Liu C M, *et al.* Identification of insecticidal constituents of the essential oil of *Curcuma wenyujin* rhizomes active against *Liposcelis*

- bostrychophila* Badonnel [J]. *Molecules*, 2012, 17(10): 12049-12060.
- [15] Emiliya C, Voja P, Andrija S, *et al.* The effect of camphor and borneol on rat thymocyte viability and oxidative stress [J]. *Molecules*, 2012, 17(9): 10258-10266.
- [16] Octavio J G, Baccarelli A A, Hyang-Min B, *et al.* CYP2E1 epigenetic regulation in chronic, low-level toluene exposure: Relationship with oxidative stress and smoking habit [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2015, 286(3): 207-215.
- [17] Anas S, Anton A, Resmi M. Identification of compounds in the essential oil of *Nutmeg* seeds (*Myristica fragrans* Houtt.) that inhibit locomotor activity in mice [J]. *Inter J Mol Sci*, 2010, 11(11): 4771-4781.
- [18] Rui F, Hong J C, Yi W X, *et al.* Insecticidal activity of essential oil of *Carum Carvi* fruits from China and its main components against two grain storage insects [J]. *Molecules*, 2010, 15(12): 9391-9402.
- [19] Jiang X P, Tang J Y, Xu Z, *et al.* Sulforaphane attenuates di-N-butylphthalate-induced reproductive damage in pubertal mice: Involvement of the Nrf2-antioxidant system [J]. *Environ Toxicol*, 2017, 32(7): 1908-1917.
- [20] Hatano V Y, Torricelli A S, Giassi A C C, *et al.* Anxiolytic effects of repeated treatment with an essential oil from *Lippia alba* and (R)-(-)-carvone in the elevated T-maze [J]. *Braz J Med Biol Res*, 2012, 45(3): 238-243.
- [21] Neto J D N, Almeida A A C D, Oliveira J D S, *et al.* Antioxidant effects of nerolidol in mice hippocampus after open field test [J]. *Neurochem Res*, 2013, 38(9): 1861-1870.
- [22] Battiprolu P K, Gillette T G, Wang Z V, *et al.* Diabetic cardiomyopathy: Mechanisms and therapeutic targets [J]. *Drug Discov Today*, 2010, 7(2): e135-e143.
- [23] 梁隽婷, 胡淑宏, 邢国利. 益气养阴活血法治疗糖尿病性心脏病疗效观察 [J]. 中医药信息, 2003, 20(3): 39.
- [24] Peng J, Lu R, Deng H W, *et al.* Involvement of α -calcitonin gene-related peptide in monophosphoryl lipid A-induced delayed preconditioning in rat hearts [J]. *Eur J Pharmacol*, 2002, 436(1): 89-96.
- [25] 罗彩莲. 丹参的药理作用与临床应用 [J]. 中国当代医药, 2012, 19(12): 11-12.
- [26] 何长国. 血府逐瘀汤配合西药治疗冠心病心绞痛 34 例 [J]. 中国临床保健杂志, 2007, 10(2): 185-186.
- [27] 杨庆福, 李彩玲, 陈 俭, 等. 复方丹参滴丸对冠心病心绞痛患者血管内皮功能的影响 [J]. 新乡医学院学报, 2003, 20(2): 127-128.
- [28] 孙学刚, 贾钰华, 陈育尧. 定心方及丹参酮对血小板膜粘附分子表达的影响 [J]. 山东中医药大学学报, 2001, 25(1): 61-63.
- [29] 周 静, 李惠芬, 王洪志, 等. 丹参水溶性成分与脂溶性成分抑菌作用的考察 [J]. 时珍国医国药, 2008, 19(9): 2130-2131.
- [30] 李彩蓉, 甘受益, 黄红霞. 丹参酮 II_A 磺酸钠对 2 型糖尿病大鼠心肌的保护作用 [J]. 湖北科技学院学报: 医学版, 2014, 28(6): 466-468.
- [31] 臧慧梅. 丹酚酸 B 通过 PPAR α 抑制 2 型糖尿病小鼠的心肌肥厚 [D]. 济南: 山东大学, 2017.
- [32] 李显辉. 丹参素对高糖环境下心肌细胞的保护作用及其机制 [J]. 山东医药, 2016, 56(45): 48-50.
- [33] 颜仁梁, 林 励. 檀香的研究进展 [J]. 中药新药与临床药理, 2003, 5(3): 218-220.
- [34] 倪 青, 汪升慧, 黄 静. 益气活血中药对糖尿病心脏病大鼠心肌细胞凋亡的影响 [J]. 北京中医药, 2016, 36(6): 560-563.
- [35] 张明发, 沈雅琴. 砂仁临床药理作用的研究进展 [J]. 抗感染药学, 2013, 10(1): 8-13.
- [36] 李 翔. 基于网络药理学的芪参益气方抗心肌缺血整合作用研究 [D]. 杭州: 浙江大学, 2014.
- [37] 艾 文, 谢培益, 陈延伟, 等. EGFR 在大鼠 1 型糖尿病心脏病纤维化作用的实验研究 [J]. 心血管康复医学杂志, 2013, 22(3): 219-222.
- [38] Dittrich E, Schmaldienst S, Soleiman A, *et al.* Rapamycin-associated post-transplantation glomerulonephritis and its remission after reintroduction of calcineurin-inhibitor therapy [J]. *Transpl Inter*, 2010, 17(4): 215-220.
- [39] 孙晓慧, 王 燕, 牟艳玲. 2 型糖尿病大鼠心肌 PI3K/Akt/mTOR 信号通路的改变及 Sirt1 的调控机制研究 [J]. 中国药理学通报, 2017, 33(6): 793-798.
- [40] 王文聪, 谢春毅. 丝裂原活化蛋白激酶 MAPK 信号通路与糖尿病心肌病关系的研究进展 [J]. 当代医学, 2016, 22(14): 8-10.
- [41] 赵 青, 万毅刚, 王朝俊, 等. 慢性肾脏病肾组织炎症信号通路 p38MAPK 的调节机制及中药的干预作用 [J]. 中国中药杂志, 2012, 37(12): 1700-1704.
- [42] 王学敏, 张 慧, 安 聪, 等. Wnt 信号通路对中枢神经系统再生修复的作用及中医药研究近况 [J]. 中医药临床杂志, 2018, 30(8): 1386-1390.
- [43] 蒋晓蕊, 苗 琳, 吴晓燕, 等. 丹参酮 II_A 对心血管系统保护作用及机制的研究进展 [J]. 中国当代医药, 2014, 21(14): 183-185.
- [44] 张 凯, 储全根, 毕华剑, 等. 抵当汤对糖尿病大鼠心肌组织 JAK2/STAT3 信号通路的影响 [J]. 安徽中医药大学学报, 2016, 35(2): 65-69.
- [45] 黄岸清. 基于 PI3K/Akt/FoxO3a 通路白藜芦醇保护糖尿病心脏病大鼠心功能的机制研究 [D]. 广州: 南方医科大学, 2017.