

基于网络药理学的丹参-红花治疗心肌梗死的作用及其机制研究

卜雕雕¹, 苏卓², 柏希慧¹, 张丹¹, 王昌利^{1*}

1. 陕西中医药大学药学院, 陕西 咸阳 712046

2. 西安交通大学药学院, 陕西 西安 710049

摘要: **目的** 运用网络药理学和实验验证的方法探究丹参-红花治疗心肌梗死(MI)的作用机制。**方法** 通过中医药系统药理学数据库和分析平台(TCMSP)检索丹参、红花的主要成分,并通过TCMSP和Swiss Target prediction数据库筛选成分靶点,结合OMIM、TTD、Genecards和NCBI(Gene)数据库获取丹参-红花治疗MI的作用靶点。应用STRING平台构建蛋白-蛋白相互作用(PPI)网络模型。应用DAVID软件进行基因本体(GO)富集分析和KEGG通路富集分析,Cytoscape构建药材-靶点和药材-成分-靶点-通路网络图,进一步进行实验验证,以揭示丹参-红花对小鼠MI的治疗作用。**结果** 筛选得到84个活性成分,检索出485个靶蛋白,与MI有关的靶点有28个。GO功能富集分析得到GO条目18个($P<0.05$),其中生物过程(BP)条目9个、分子功能(CC)条目3个、细胞组成(MF)条目6个。KEGG通路富集筛选得到30条信号通路($P<0.05$),涉及缺氧诱导因子信号通路以及肿瘤坏死因子、血管内皮生长因子、鞘磷脂类、小G蛋白Rap1等与MI相关的信号通路。HE染色和Masson染色结果显示,丹参-红花不同剂量组能明显改善心肌损伤,Western blotting结果显示,丹参-红花能下调肿瘤坏死因子- α (TNF- α)和有丝分裂原活化蛋白激酶(MAPK)表达来改善心肌损伤。**结论** 应用网络药理学方法阐释了丹参-红花治疗MI的作用靶点及通路,为后续深入阐明丹参-红花治疗MI提供科学依据。

关键词: 丹参; 红花; 心肌梗死; 网络药理学; 缺氧诱导因子信号通路; 肿瘤坏死因子; 血管内皮生长因子; 鞘磷脂类; 小G蛋白Rap1; 肿瘤坏死因子- α (TNF- α); 有丝分裂原活化蛋白激酶(MAPK)

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2020)10-2807-12

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.10.023

Effect and mechanism of *Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma* and *Carthami Flos* on myocardial infarction based on network pharmacology

BU Diao-diao¹, SU Zhuo², BAI Xi-hui¹, ZHANG Dan¹, WANG Chang-li¹

1. College of Pharmacy, Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang 712046, China

2. School of Pharmacy, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710049, China

Abstract: Objective To study the mechanism of *Salviae Miltiorrhizae Radix* (SMR) *et Rhizoma* and *Carthami Flos* (CF) in the treatment of myocardial infarction (MI) by means of network pharmacology and experimental verification. **Methods** The main components of SMR-CF were searched by Traditional Chinese Medicine System Pharmacological Analysis Platform (TCMSP), and the component targets were screened by TCMSP and Swiss Target prediction databases, and the MI related targets were queried through OMIM, TTD, Genecards and NCBI (Gene) databases. The common target proteins of disease and drug components were screened by the intersection of drug targets and disease targets. The network model of protein-protein interaction (PPI) was constructed by using STRING platform. The functional enrichment analysis of gene ontology (GO) and the KEGG pathway were carried out by using DAVID. Cytoscape was used to construct medicinal material-target and medicinal material-composition-target-pathway network map for further experimental verification, in order to reveal the therapeutic effect of SMR-CF on MI in mice. **Results** A total of 84 active components were screened from SMR and CF, 485 target proteins were searched, and 28 targets related to MI were found. GO functional enrichment analysis showed that there were 18 GO entries, including 9 biological process (BP) entries, three molecular functional (MF) entries and six cell composition (CC) entries. KEGG pathway was enriched and screened to obtain 30 signal pathways,

收稿日期: 2019-11-10

基金项目: 国家自然科学基金项目(81373944)

作者简介: 卜雕雕,在校硕士生,从事中药制剂工艺质量评价体系的研究。Tel: 15771809760 E-mail: 15771809760@163.com

*通信作者 王昌利(1958—),男,教授,硕士生导师,从事中药新制剂与新技术。Tel: 13709103433 E-mail: wc13433@163.com

such as hypoxia inducible factor signaling pathway, tumor necrosis factor, vascular endothelial growth factor, sheath phospholipid, small G protein Rap1 and so on. The results of HE staining and Masson staining showed that SMR-CF could significantly improve myocardial injury. Western blotting results showed that SMR-CF could down-regulate the expression of TNF- α and MAPK to improve myocardial injury. **Conclusion** The target and pathway of SMR-CF in the treatment of MI are explained by network pharmacology, which provides a scientific basis for the further clarification of SMR-CF in the treatment of MI.

Key words: *Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma*; *Carthamii Flos*; myocardial infarction; network pharmacology; HIF signaling pathway; tumor necrosis factor; vascular endothelial growth factor; sphingophospholipids sphingomyelins; small G protein Rap1; tumor necrosis factor- α ; mitogen activated protein kinase

根据《中国心血管报告 2017》显示, 心血管疾病死亡率居城乡居民总死亡率的首位, 且患病率和死亡率仍处于上升阶段, 其中心肌梗死 (myocardial infarction, MI) 是关键致死因素^[1]。MI 是在冠状动脉病变的基础上, 发生冠状动脉血供急剧减少或中断, 使相应的心肌严重而持久地缺血所致的部分心肌急性坏死^[2], 其发病急, 病死率高, 并发症多。研究表明, 中药在预防和治疗 MI 的过程中具有较低的毒性和较高的活性, 中医药在治疗 MI 方面有了一定的发展, 并展现出巨大的潜力, 因此, 研究和开发抗 MI 的中药具有广阔的前景^[3]。

丹参为唇形科植物丹参 *Salviae miltiorrhizae* Bge. 的干燥根及根茎, 性微寒, 味苦, 归心、肝经, 功效为活血调经、祛瘀止痛、凉血消痈、除烦安神。红花为菊科植物红花 *Carthamus tinctorius* L. 的干燥花, 性温, 味辛, 归心、肝经, 功效为活血通经、祛瘀止痛、解毒。丹参具有活血化瘀的功效, 红花具有通络止痛的功效, 丹参-红花配伍是经典的活血药对^[4], 两药合用共奏活血化瘀、通脉疏络之功^[5]。两药配伍后的提取物在临床上被广泛用于治疗心脑血管疾病^[6-9], 且已被开发成 20 多种中成药, 其中丹参-红花注射液年销售额已超 40 亿元。

中医药具有整体观和辨证论治的特点, 在中国及亚洲地区, 有着几千年丰富的临床经验, 为人类的健康和疾病的治疗做出了不容忽视的贡献, 但由于中药及其复方具有多成分、多靶点、协同作用的特点, 使探讨中药复方的物质基础和作用机制等问题成为中药现代化的难点和关键^[10]。直到网络药理学的出现, 为中医药现代化提供了新的机遇。2007 年 Hopkins^[11]在 *Nature Biotechnology* 上首次发文明确了网络药理学的概念, 网络药理学的概念在 2010 年被我国学者引入并广泛用于中药及复方的研究^[12]。网络药理学具有整体性、系统性的特点, 这与中医药整体观和辨证论治的特点不谋而合。因此, 在中医药现代化进程中, 一些中医药研究者借鉴网络药

理学的研究思路, 揭示中药及其复方多途径、多靶点、多成分的综合整体效应并取得了一定的成果。本研究拟通过网络药理学方法和实验验证的方法, 分析丹参-红花治疗 MI 的作用机制, 为丹参-红花药对治疗 MI 提供细胞分子层面的参考。

1 材料与方法

1.1 药物成分的筛选

在中药系统网络药理学数据库和分析平台 (TCMSP, <http://lsp.nwu.edu.cn/tcmsp.php>) 中, 以“丹参”“红花”为关键词, 选择口服生物利用度 (OB) $\geq 30\%$ 和类药性 (DL) ≥ 0.18 者作为筛选出的活性成分^[13]。并保存为 Sybyl Mol2 format (.mol2) 格式。利用 OpenBabel 软件的 convert 功能将上述的 Sybyl Mol2 format (.mol2) 格式文件转化为 Sdf-MDL MOL format (sdf) 格式文件备用^[14]。

1.2 药物靶点的筛选

活性成分靶点的收集分为 2 部分, 一部分, 收集 TCMSP 数据库中药材的靶点; 另一部分, 进入 Swiss Target Prediction (<http://www.swisstargetprediction.ch/>) 数据库, 在绘图区粘贴上述 Sdf-MDL MOL format 格式文件, 点击 Import-Predict the target 即可输出化合物靶点信息^[15]。

在数据库搜索的药物靶点命名存在不规范问题, 故把所有靶点导入 UniProt (<https://www.uniprot.org/>) 数据库中, 输入靶点蛋白名称限定物种为“Homo sapiens”, 将所有蛋白名称均校正为其官方名称 (official symbol)。

1.3 疾病相关靶点的筛选

通过 OMIM (<http://www.omim.org/>)^[16]、TTD (<http://bidd.nus.edu.sg/group/cjttd/>)^[17]、GeneCards (<https://www.genecards.org/>)^[18] 和 NCBI-Gene (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>)^[19] 数据库, 以“myocardial infarction”为关键词搜索与 MI 有关的基因。将查询到的与 MI 有关的靶点与药材靶点取交集, 筛选丹参-红花治疗 MI 可能潜在的靶点。

1.4 蛋白质相互作用(PPI)网络的构建

为了进一步了解药物靶点和疾病靶点在蛋白水平上的作用机制,本研究将“1.3”项得到的交集基因带入在线网站 STRING 10.5 (<https://string-db.org>) 获取蛋白相互作用的关系。

1.5 GO 功能富集分析和 KEGG 通路富集分析

利用生物学信息注释数据库(DAVID, <https://david.ncifcrf.gov/summary.jsp>, Version 6.8) 进行基因本体(GO)分析和 KEGG 通路分析。根据 $P < 0.05$ 作为筛选条件,得到 GO 生物学功能分析结果和 KEGG 通路富集分析结果。

1.6 网络构建

采用 Cytoscape 3.6.1 软件构建网络图:(1)丹参-红花活性成分-靶点网络图;(2)丹参-红花治疗 MI 的潜在化合物-靶点-通路网络图。

1.7 动物实验验证

1.7.1 实验动物 成年 10~14 周龄雄性 BALB/c 小鼠,体质量 22~28 g,由空军军医大学(原第四军医大学)实验动物中心提供,动物合格证号 SCXK(军)2012-0007。在标准实验条件[温度(25 ± 2)℃,湿度(60 ± 5)%,12/12 h 昼/夜循环]下适应性饲养 1 周。本研究获陕西中医药大学动物伦理委员会批准。

1.7.2 丹参-红花提取物的制备 根据人鼠药物剂量换算关系表,红花成人每日剂量为 18 g,换算 20 g 小鼠的剂量为 $18 \text{ g} \times 0.0026 = 0.0468 \text{ g}$,再经过换算得红花每只大鼠每日给药量为 2.34 g/kg。丹参成人每日剂量为 25 g。本实验丹参-红花(1:1)按照红花每日用量取丹参-红花各 18 g。按照文献的煎煮方法^[20]煎煮丹参-红花饮片,饮片放入温水浸泡 30 min,煎煮 2 次,第 1 次煎煮加水 7 倍,第 2 次煎煮加水 4 倍,将 2 次煎煮滤液合并,浓缩至生药最终质量浓度分别为 0.936、0.468、0.234 g/mL(对应剂量为 9.36、4.68、2.34 g/kg)。

1.7.3 模型的制备及给药方法^[21-22] 取 60 只成年 10~14 周龄雄性 BALB/c 小鼠,戊巴比妥钠(60 mg/kg) ip 麻醉。麻醉生效后小鼠固定于实验台(配备有 37℃恒温加热垫),剃毛备皮后,先行气管插管术,用 MiniVent(型号 845, Harvard Apparatus, USA)小动物呼吸机给予机械通气;沿胸骨左缘 2~3 mm 处做一长约 1.5~2.0 cm 的纵行切口,钝性分离胸壁肌肉,显微镊探入第 4、5 肋间并撑开胸壁,自制拉钩拉开胸骨充分显露左心耳及

左心室(冠状动脉左前降支自左心耳下缘向下走行于左心室前壁,有时可见)。体视显微镜下找到冠状动脉左前降支(LAD),用 8/0 单丝丙纶缝线在左心耳下缘 2 mm 处进针出针并结扎,造成结扎线以下冠脉永久缺血;拿掉拉钩后关闭胸腔、缝合皮肤,待动物恢复自主呼吸后,拔出气管插管。整个过程在解剖显微镜下操作。假手术组为开胸后在 LAD 两侧进针出针但不结扎,其余手术操作过程同手术组。以 ST 段抬高作为模型建立成功的标准,术后第 2 天药物组以 9.36、4.68、2.34 g/(kg·d) 的剂量连续 ig 丹参-红花汤剂 28 d,假手术组和模型组分别 ig 给予生理盐水 28 d。

1.7.4 样品的采集 经过 28 d 给药后,麻醉小鼠,迅速取出心脏组织。将每只小鼠的心脏组织分成 2 部分,在左心室右室乳头肌水平切取 2~3 mm 环状切片固定在 10%甲醛溶液中用于心肌组织病理学观察,其余组织存放在液氮中供后续检测心肌组织中蛋白使用。

1.7.5 心肌组织病理学检查 心脏组织用预冷的生理盐水冲洗干净,于 10%甲醛溶液中固定 24 h。常规取材,脱水,石蜡包埋,制片, Hematoxylin-eosin(HE)、Masson 染色,显微镜(DP-73, OLYMPUS, Japan)下观察心肌组织病理学变化。

1.7.6 蛋白免疫印迹分析 取心肌组织 50 mg,加入 1 mL 蛋白裂解液,冰上匀浆,4℃、12 000 r/min 离心 20 min,取上清,即得总蛋白。Bicinchoninic acid(BCA)法测定蛋白质量浓度。每孔上样量 20~40 μg 蛋白,于 10%和 5%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)中电泳,停止电泳后,立刻转印至 PVDF 膜,转印结束后,取出膜,5%脱脂牛奶封闭液封闭 1 h。加入一抗 4℃孵育过夜,洗膜 5 min。加入二抗,室温下孵育 1.5 h,洗膜 5 min。加入 ECL 显色液进行底物发光,用凝胶图像处理系统(Gel-Pro-Analyzer 软件)分析蛋白条带的吸光度值,用目的蛋白和内参蛋白吸光度值比值表示蛋白相对表达量。

1.7.7 数据处理 实验数据用 SPSS 24.0 软件进行分析,通过单因素方差分析(ANOVA)或 Dunnett's *t* test 对各组进行量化。数据结果表示为 $\bar{x} \pm s$ 。 P 值 < 0.05 表示具有统计学意义。

2 结果

2.1 丹参-红花活性成分筛选

从 TCMSP 数据库根据条件 $OB \geq 30\%$ 和 $DL \geq$

0.18 筛选得到丹参符合条件的化学成分有 65 个, 红花符合条件的化学成分 22 个, 其中 poriferast-5-en-3 β -ol、黄芩苷、木犀草素为丹参和红花共有的化学成分。

2.2 丹参-红花治疗 MI 潜在靶点选择

丹参-红花的 84 个活性成分 (表 1) 从 Swiss

Target Prediction 数据库中预测到 306 个靶点, TCMSP 数据库中预测到 252 个靶点, 去除重复的靶基因, 共得到 486 个化合物靶点, 见图 1。与 TTD、OMIM、NCBI-GENE、GeneCards 数据库搜索的与 MI 相关的靶点取交集得到 28 个丹参-红花治疗 MI 潜在的作用靶点, 见图 2 和表 2。

表 1 丹参-红花主要成分

Table 1 Main components of SMR and CF

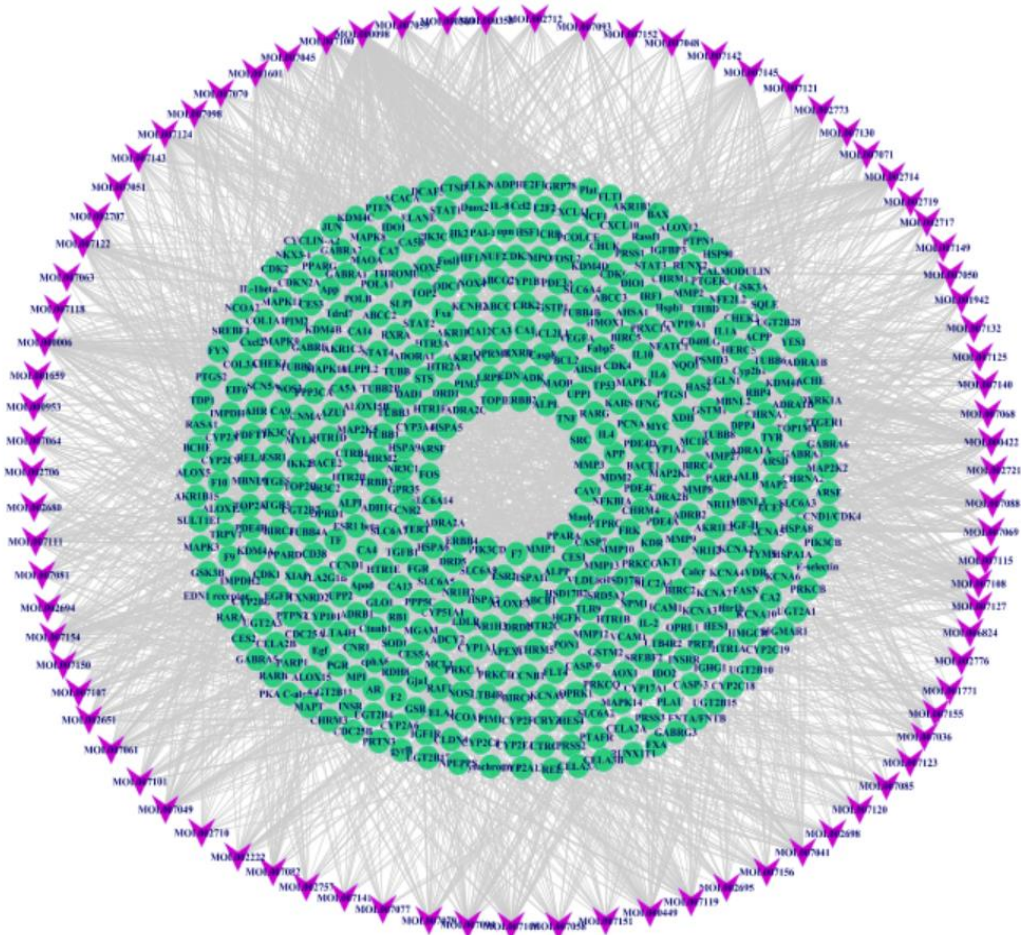
编号	化合物	相对分子质量	OB/%	DL	成分归属
MOL001601	1,2,5,6-tetrahydrotanshinone (1,2,5,6-四氢丹参酮)	280.34	38.75	0.36	丹参
MOL001659	poriferasterol (多孔甾醇)	412.77	43.83	0.76	丹参
MOL001771	poriferast-5-en-3 β -ol	414.79	36.91	0.75	丹参, 红花
MOL001942	isoimperatorin (异欧前胡素)	270.30	45.46	0.23	丹参
MOL002222	sugiol (柳杉酚)	300.48	36.11	0.28	丹参
MOL002651	dehydrotanshinone II _A (去氢丹参酮 II _A)	292.35	43.76	0.40	丹参
MOL002776	baicalin (黄芩苷)	446.39	40.12	0.75	丹参, 红花
MOL000569	digallate	322.24	61.85	0.26	丹参
MOL000006	luteolin (木犀草素)	286.25	36.16	0.25	丹参, 红花
MOL006824	α -amyrin (α -香树精)	426.80	39.51	0.76	丹参
MOL007036	5,6-dihydroxy-7-isopropyl-1,1-dimethyl-2,3-dihydrophenanthren-4-one	298.41	33.77	0.29	丹参
MOL007041	2-isopropyl-8-methylphenanthrene-3,4-dione (2-异丙基-8-甲基菲-3,4-二酮)	264.34	40.86	0.23	丹参
MOL007045	3 α -hydroxytanshinoneII _A (3 α -羟基丹参酮)	310.37	44.93	0.44	丹参
MOL007048	(E)-3-[2-(3,4-dihydroxyphenyl)-7-hydroxy-benzofuran-4-yl]acrylic acid	312.29	48.24	0.31	丹参
MOL007049	4-methylenemiltirone (4-亚甲丹参新酮)	266.36	34.35	0.23	丹参
MOL007050	2-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-5-(3-hydroxypropyl)-7-methoxy-3-benzofurancarboxaldehyde	356.40	62.78	0.40	丹参
MOL007051	6-O-syringyl-8-O-acetyl shanzhiside methyl ester (6-O-丁香基-8-O-乙酰基山柽苷甲酯)	628.64	46.69	0.71	丹参
MOL007058	formyltanshinone (醛基丹参酮)	290.28	73.44	0.42	丹参
MOL007059	3-beta-hydroxymethylenetanshinquinone	294.32	32.16	0.41	丹参
MOL007061	methylenetanshinquinone (亚甲基丹参醌)	278.32	37.07	0.36	丹参
MOL007063	przewalskin a (紫丹参萜 a)	398.49	37.11	0.65	丹参
MOL007064	przewalskin b (紫丹参萜 b)	330.46	110.32	0.44	丹参
MOL007068	przewaquinone B (紫丹参乙素)	292.30	62.24	0.41	丹参
MOL007069	przewaquinone C (紫丹参素 C)	296.34	55.74	0.40	丹参
MOL007070	(6S,7R)-6,7-dihydroxy-1,6-dimethyl-8,9-dihydro-7H-naphtho[8,7-g]benzofuran-10,11-dione	312.34	41.31	0.45	丹参
MOL007071	przewaquinone f (紫丹参己素)	312.34	40.31	0.46	丹参
MOL007077	sclareol (硬尾醇)	308.56	43.67	0.21	丹参
MOL007079	tanshinaldehyde (丹参醛)	308.35	52.47	0.45	丹参
MOL007081	danshenol B (丹参醇 B)	354.48	57.95	0.56	丹参
MOL007082	danshenol A (丹参醇 A)	336.41	56.97	0.52	丹参

续表 1

编号	化合物	相对分子质量	OB/%	DL	成分归属
MOL007085	salvileneone (鼠尾草呋喃嵌苯)	292.40	30.38	0.38	丹参
MOL007088	cryptotanshinone (隐丹参酮)	296.39	52.34	0.40	丹参
MOL007093	dan-shexinkum d (丹参新醌)	336.41	38.88	0.55	丹参
MOL007094	danshenspiroketallactone (丹参螺缩酮内酯)	282.36	50.43	0.31	丹参
MOL007098	deoxyneocryptotanshinone (脱氧基新隐丹参酮)	298.41	49.40	0.29	丹参
MOL007100	dihydrotanshinlactone (二氢丹参内酯)	266.31	38.68	0.32	丹参
MOL007101	dihydrotanshinone I (二氢丹参酮 I)	278.32	45.04	0.36	丹参
MOL007105	epidanshenspiroketallactone (表丹参螺缩酮内酯)	284.38	68.27	0.31	丹参
MOL007107	C09092	286.50	36.07	0.25	丹参
MOL007108	isocryptotanshinone (异隐丹参酮)	296.39	54.98	0.39	丹参
MOL007111	isotanshinone II (异丹参酮 II)	294.37	49.92	0.40	丹参
MOL007115	manool (泪柏醇)	304.57	45.04	0.20	丹参
MOL007118	microstegiol	298.46	39.61	0.28	丹参
MOL007119	miltionone I (丹参醌新酮 I)	312.39	49.68	0.32	丹参
MOL007120	miltionone II (丹参醌新酮 II)	312.39	71.03	0.44	丹参
MOL007121	multipolone (丹参环庚三烯酚酮)	300.43	36.56	0.37	丹参
MOL007122	miltirone (丹参新酮)	282.41	38.76	0.25	丹参
MOL007123	miltirone II (丹参新酮 II)	272.32	44.95	0.24	丹参
MOL007124	neocryptotanshinone II (脱氧基新隐丹参酮)	270.35	39.46	0.23	丹参
MOL007125	neocryptotanshinone (新隐丹参酮)	314.41	52.49	0.32	丹参
MOL007127	1-methyl-8,9-dihydro-7H-naphtho [5,6-g] benzofuran-6,10,11-trione	280.29	34.72	0.37	丹参
MOL007130	prolithospermic acid (原紫草酸)	314.31	64.37	0.31	丹参
MOL007132	(2R)-3-(3,4-dihydroxyphenyl)-2-[(Z)-3-(3,4-dihydroxyphenyl) acryloyl]oxy-propionic acid	360.34	109.38	0.35	丹参
MOL007140	(Z)-3-[2-[(E)-2-(3,4-dihydroxyphenyl)vinyl]-3,4-dihydroxy-phenyl] acrylic acid	314.31	88.54	0.26	丹参
MOL007141	salvianolic acid G (丹酚酸 G)	340.30	45.56	0.61	丹参
MOL007142	salvianolic acid J (丹酚酸 J)	538.49	43.38	0.72	丹参
MOL007143	salvileneone I (鼠尾草呋喃嵌苯 I)	270.40	32.43	0.23	丹参
MOL007145	salviolone (鼠尾草酚酮)	268.38	31.72	0.24	丹参
MOL007149	NSC 122421	300.48	34.49	0.28	丹参
MOL007150	(6S)-6-hydroxy-1-methyl-6-methylol-8,9-dihydro-7H-naphtho [8,7-g] benzofuran-10,11-quinone	312.34	75.39	0.46	丹参
MOL007151	tanshindiol B (丹参二醇 B)	312.34	42.67	0.45	丹参
MOL007152	przewaquinone E	312.34	42.85	0.45	丹参
MOL007154	tanshinone II _A (丹参酮 II _A)	294.37	49.89	0.40	丹参
MOL007155	(6S)-6-(hydroxymethyl)-1,6-dimethyl-8,9-dihydro-7H-naphtho [8,7-g] benzofuran-10,11-dione	310.37	65.26	0.45	丹参
MOL007156	tanshinone VI (丹参酮 VI)	296.34	45.64	0.30	丹参
MOL002680	flavoxanthin (毛茛黄素)	584.96	60.41	0.56	红花
MOL002694	4-[(E)-4-(3,5-dimethoxy-4-oxo-1-cyclohexa-2,5-dienylidene) but-2-enylidene]-2,6-dimethoxycyclohexa-2,5-dien-1-one	356.40	48.47	0.36	红花
MOL002695	lignan	458.55	43.32	0.65	红花
MOL002698	lupeol-palmitate (羽扇烯基棕榈酸酯)	665.26	33.98	0.32	红花

续表 1

编号	化合物	相对分子质量	OB/%	DL	成分归属
MOL002706	phytoene (八氢番茄红素)	545.04	39.56	0.50	红花
MOL002707	phytofluene (六氢番茄红素)	543.02	43.18	0.50	红花
MOL002710	pyrethrin II (除虫菊素-II)	372.50	48.36	0.35	红花
MOL002712	6-hydroxykaempferol (6-羟基山柰酚)	302.25	62.13	0.27	红花
MOL002714	baicalein (黄芩素)	270.25	33.52	0.21	红花
MOL002717	carthamone (醌式红花苷)	286.25	51.03	0.20	红花
MOL002719	6-hydroxynaringenin (6-羟基柚皮素)	288.27	33.23	0.24	红花
MOL002721	quercetagetin (栎草亭)	318.25	45.01	0.31	红花
MOL002757	7,8-dimethyl-1 <i>H</i> -pyrimido [5,6- <i>g</i>] quinoxaline-2,4-dione	242.26	45.75	0.19	红花
MOL002773	beta-carotene (β-胡萝卜素)	536.96	37.18	0.58	红花
MOL000358	beta-sitosterol (β-甾醇)	414.79	36.91	0.75	红花
MOL000422	kaempferol (山柰酚)	286.25	41.88	0.24	红花
MOL000449	stigmasterol (豆甾醇)	412.77	43.83	0.76	红花
MOL000953	CLR	386.73	37.87	0.68	红花
MOL000098	quercetin (槲皮素)	302.25	46.43	0.28	红花



箭头节点表示活性成分，圆形节点表示靶点

The arrow node represents the active ingredient, and the circular node represents the target

图 1 丹参-红花主要成分靶点网络

Fig. 1 Target network of main components of SMR and CF

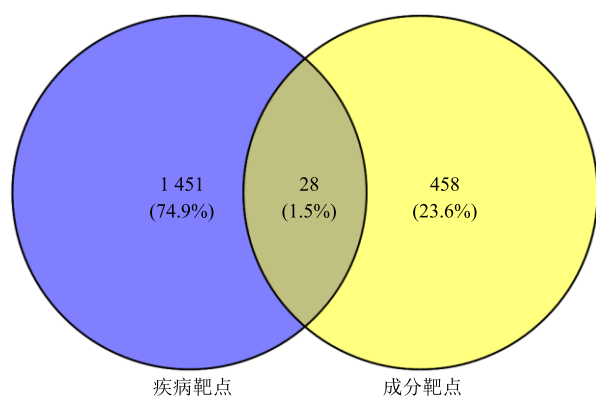


图 2 成分靶点-疾病靶点韦恩图

Fig. 2 Venn diagram of component target-disease target

2.3 PPI 网络图

将 28 个基因带入 String 数据库进行分析, 结果见图 3。网络图中包含 28 个节点, 135 条边, 平均节点度为 9.64, 其中节点表示蛋白, 边则表示蛋白与蛋白之间的相互作用关系, 线条越粗表示关联度越大。

2.4 GO 功能富集分析结果

将丹参-红花治疗 MI 的潜在的 28 个作用靶点用 DAVID 进行 GO 生物学功能富集分析。GO 属于基因功能分类体系, 有 3 个分支, 包括生物过程 (biological process)、分子功能 (molecular function)

表 2 丹参-红花治疗 MI 潜在靶点

Table 2 Potential targets of SMR and CF in treatment of myocardial infarction

编号	Uniprot ID	基因	蛋白	编号	Uniprot ID	基因	蛋白
1	P08709	F7	coagulation factor VII	16	P28482	MAPK1	mitogen-activated protein kinase 1
2	P05164	MPO	myeloperoxidas	17	P06213	INSR	insulin receptor
3	P10275	AR	androgen receptor	18	P09601	HMOX1	heme oxygenase 1
4	Q16539	MAPK14	mitogen-activated protein kinase 14	19	P12004	PCNA	proliferating cell nuclear antigen
5	P07204	THBD	thrombomodulin	20	O14684	PTGES	prostaglandin E synthase
6	P29965	CD40LG	CD40 ligand	21	P02741	CRP	c-reactive protein
7	P15692	VEGFA	vascular endothelial growth factor A	22	P37231	PPARG	peroxisome proliferator activated receptor gamma
8	P01375	TNF	tumor necrosis factor	23	P40763	STAT3	signal transducer and activator of transcription 3
9	P09960	LTA4H	leukotriene A-4 hydrolase	24	P09488	GSTM1	glutathione S-transferase mu 1
10	P04035	HMGR	3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase	25	P05362	ICAM1	intercellular adhesion molecule 1
11	P08254	MMP3	stromelysin-1	26	P01579	IFNG	interferon gamma
12	P00749	PLAU	urokinase-type plasminogen activator	27	P07339	CTSD	cathepsin D
13	P25101	EDNRA	endothelin-1 receptor	28	Q96PH1	NOX5	NADPH oxidase 5
14	P29474	NOS3	nitric-oxide synthase, endothelial				
15	P09917	ALOX5	arachidonate 5-lipoxygenase				

和细胞组分 (cellular component), GO 生物学功能富集分析结果表明了丹参-红花治疗 MI 的药效机制涉及细胞因子活性 (cytokine activity)、蛋白磷酸酶结合 (protein phosphatase binding) 等分子功能, 细胞表面 (cell surface)、质膜外侧面 (external side of plasma membrane) 等细胞组分, 一氧化氮生物合成过程的正向调控 (positive regulation of nitric oxide biosynthetic process)、细胞对脂多糖的反应 (cellular response to lipopolysaccharide) 等生物过程, 可从中得出丹参-红花治疗 MI 主要体现在酶、细胞反应、细胞活性等方面。丹参-红花治疗 MI 靶点 GO 富集结果见图 4。

2.5 KEGG 通路富集分析结果

KEGG 通路富集分析结果显示, 35 个通路被富集, $P < 0.01$ 的通路有 21 条, 包括缺氧诱导因子信号通路 (HIF-1 signaling pathway)、肿瘤坏死因子信号通路 (TNF signaling pathway)、血管内皮生长因子信号通路 (VEGF signaling pathway)、鞘磷脂类信号通路 (sphingolipid signaling pathway)、小 G 蛋白 Rap 信号通路 (Rap1 signaling pathway) 等。丹参-红花治疗 MI 靶点 KEGG 通路富集结果见图 5。说明丹参-红花主要活性成分的作用靶点分布在不同的信号通路上, 多成分、多靶点互相调节发挥治疗 MI 的作用。

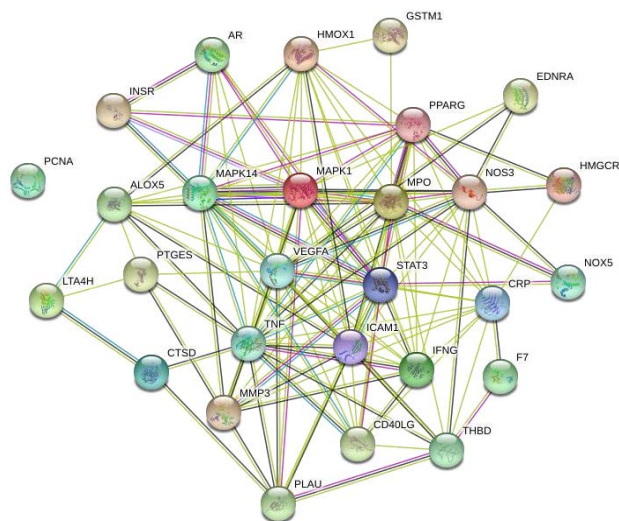


图 3 丹参-红花治疗 MI 靶点 PPI 网络

Fig. 3 PPI network of targets in treatment of myocardial infarction by SMR and CF

2.6 药材-成分-靶点-通路图

采用 Cytoscape 软件的 Merge 功能构建成分-靶点-通路网络图, 见图 6。该网络有 89 个节点, 37 个成分 (蓝色节点)、17 个靶点 (粉色节点)、35 条通路 (黄色节点) 和 220 条边, 图中节点大小反映度值的大小, 从图中可以看出, 丝裂原活化蛋白

激酶 14 (MAPK14)、丝裂原活化蛋白激酶 1 (MAPK1)、肿瘤坏死因子 (TNF)、过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (PPARG)、血管内皮生长因子 A (VEGFA) 等靶点拥有较高的度值, 表明这些靶点可能为治疗 MI 的核心靶点。后续实验对其中 2 个靶点 TNF 和 MAPK1 进行了验证。

2.7 实验验证

2.7.1 HE 染色结果 HE 染色结果见图 7。结果显示假手术组心肌组织结构正常, 无明显病理结果改变。模型组心肌病理改变较大, 左心室壁变薄, 部分样本心室壁变薄明显, 出现大面积的心肌梗死及心肌纤维化, 成纤维细胞增生明显。药物组不同程度地改善了心肌损伤。

2.7.2 Masson 染色结果 Masson 染色结果见图 8。结果显示假手术组心肌细胞排列整齐, 心肌间质中基本上没有成纤维细胞增生。模型组心肌间质胶原沉积明显, 心肌纤维化严重。与模型组相比, 药物组心肌成纤维细胞增生明显减少, 心肌间质纤维化程度有明显改善。

2.7.3 Western blotting 检测结果 Western blotting 结果如图 9 所示, 模型组小鼠心肌组织中 TNF- α 和 P38MAPK 水平比假手术组显著上升 ($P < 0.05$),

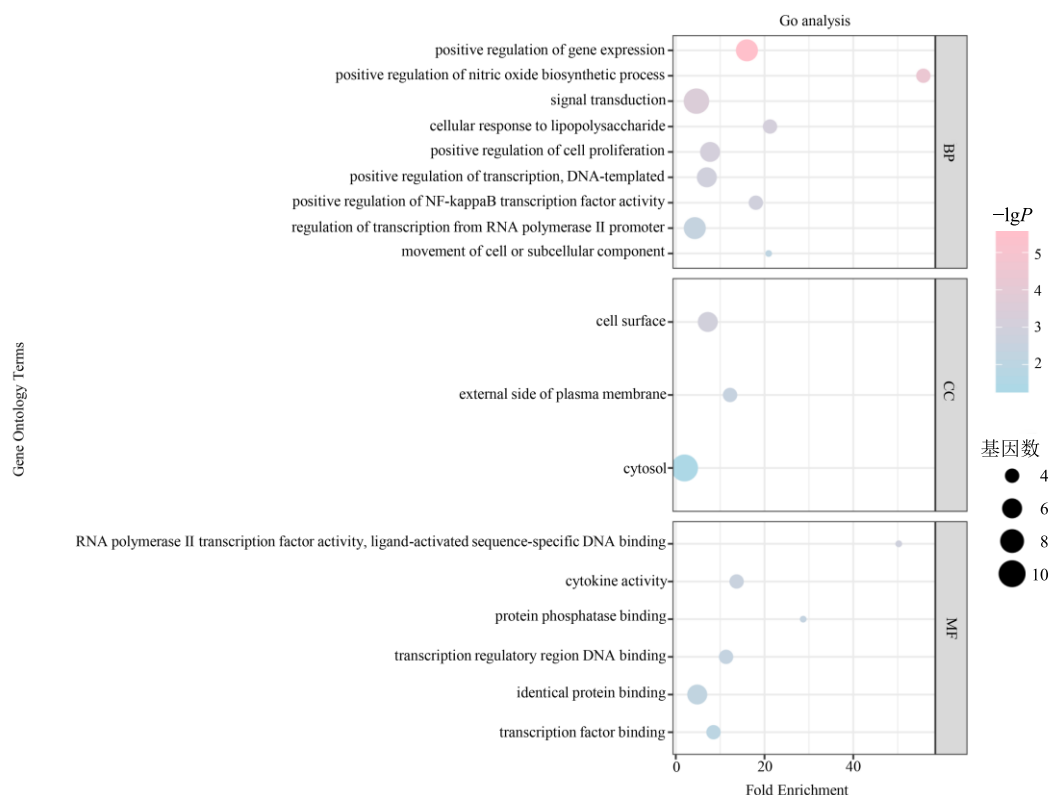


图 4 丹参-红花治疗 MI 靶点 GO 富集

Fig. 4 GO enrichment of SMR and CF in treatment of myocardial infarction

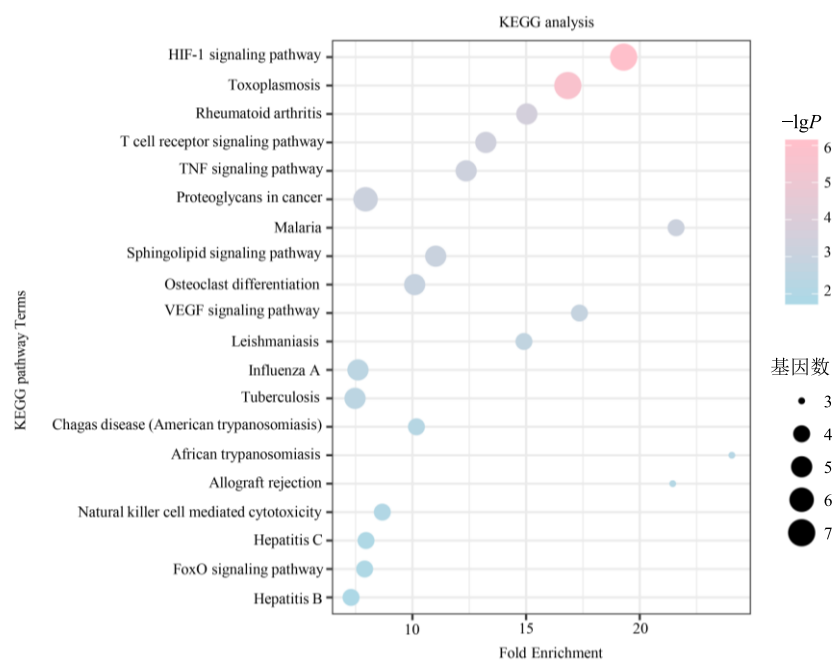
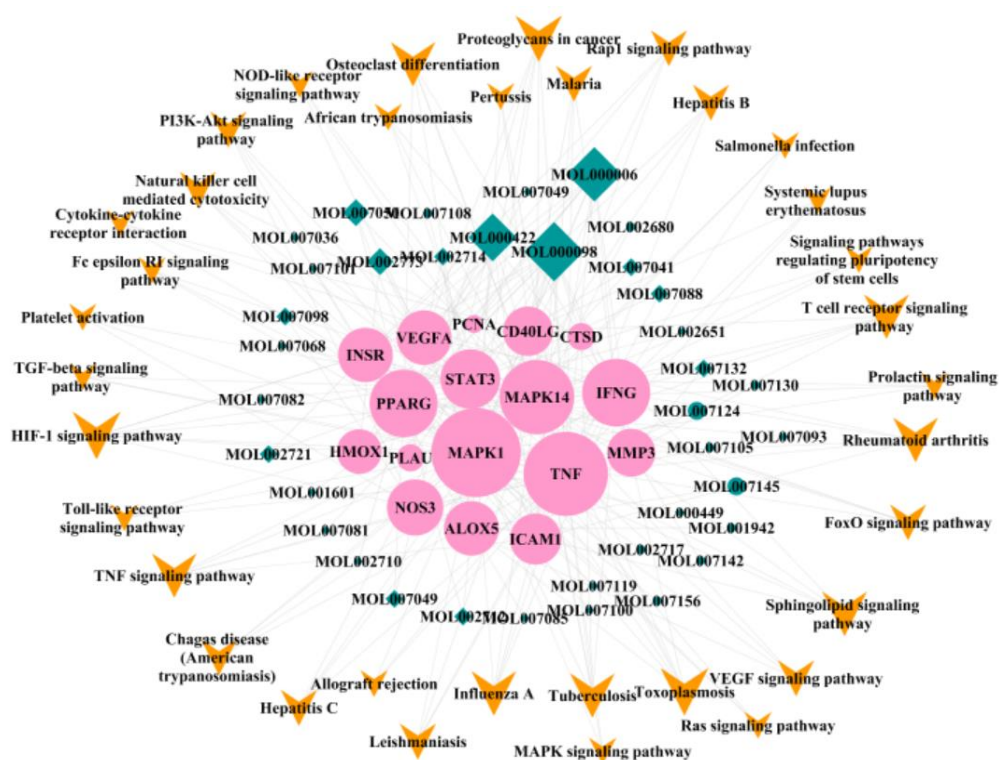


图 5 丹参-红花治疗 MI 靶点 KEGG 通路富集

Fig. 5 Enrichment of KEGG pathway in SMR and CF therapy for myocardial infarction



箭头代表信号通路，圆形代表靶点，方形代表化学成分

The arrow represents the signal pathway, the circle represents the target, and the square represents the chemical composition

图 6 丹参-红花治疗 MI 成分-靶点-通路图

Fig. 6 Composition-target-pathway diagram of SMR and CF in treatment of myocardial infarction

丹参-红花低、中、高剂量组可减少 TNF- α 和 P38MAPK 的蛋白表达水平 ($P < 0.05$)。

3 讨论

丹参对心血管系统有保护作用，对于心肌缺血

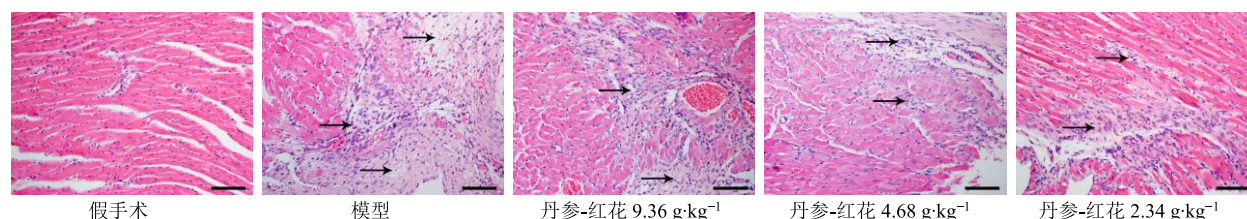


图 7 各组心肌组织 HE 染色 (×200)

Fig. 7 HE staining of myocardial tissue in each group (× 200)

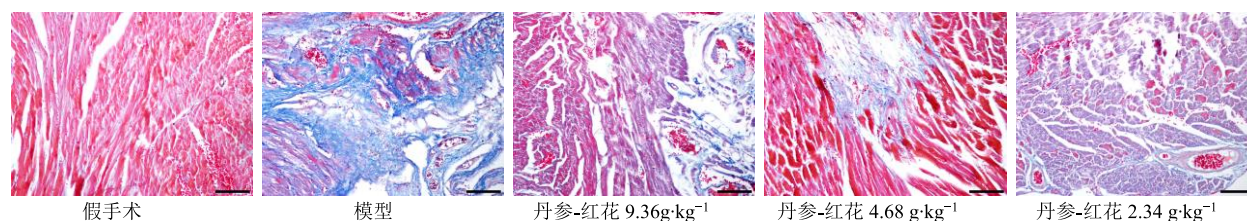
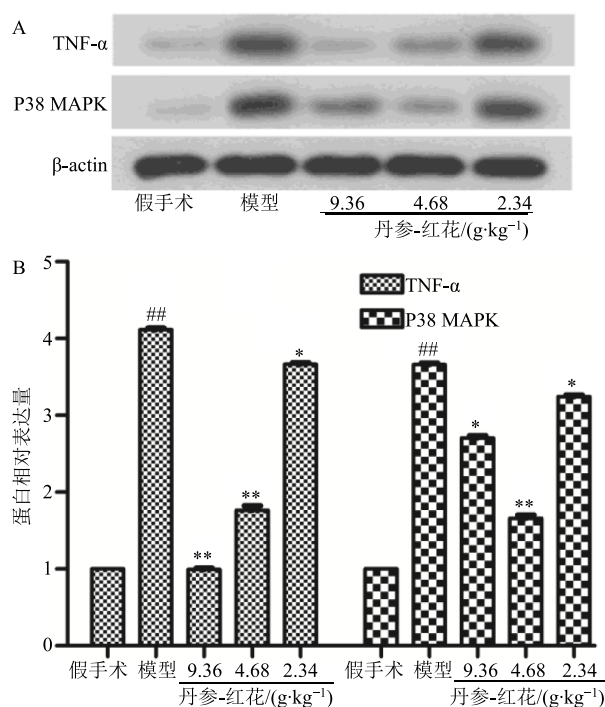


图 8 各组心肌组织 Masson 染色 (×200)

Fig. 8 Masson staining of myocardial tissue in each group (× 200)

与假手术组比较: ^{##} $P < 0.01$; 与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ ^{##} $P < 0.01$ vs sham operation group; ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ vs model group图 9 各组小鼠心肌组织中 TNF- α 、P38MAPK 蛋白表达水平 ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)Fig. 9 Expression levels of TNF and P38MAPK proteins in myocardial tissues of mice in each group ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

后产生的氧自由基所激活的应急激活的蛋白 (SAP) 激酶的活性具有抑制作用, 亦可抑制激活的 SAP 激酶转导到细胞核中, 从而减少细胞凋亡, 在缺血损伤的过程中发挥心肌保护的作用^[23], 从而改善心室重构。研究表明丹参中的成分丹参酮 II_A、丹酚酸 B、

隐丹参酮等能使细胞及动物模型中内皮型 NO 合酶 (eNOS) 的活性上调, 亦可使 eNOS 的蛋白和 mRNA 表达增加, 从而保护心肌、抗心律失常^[24]。红花有扩张冠状动脉及血管和改善血液流变学指标的作用。其有效成分红花黄色素能降低血瘀模型大鼠的血黏度和红细胞聚集指数^[25-26], 抗凝血和抗血栓形成; 羟基红花黄色素 A 能延长小鼠凝血时间, 缓解脑缺血诱发的脑血栓^[27]; Huang 等^[28]研究表明红花黄色素能抑制血小板活化因子 (PAF) 诱导血小板聚集和 5-羟色胺 (5-HT) 的释放。实验报道, 将丹参和红花提取物的有效部位配伍使用能有效缓解心肌缺血再灌注大鼠心肌损伤, 进而改善心肌缺血^[29]。临床上常将丹参与红花作为经典药对, 用于心血管疾病的治疗。然而, 丹参与红花治疗 MI 的机制尚未进行系统深入的研究。

本研究从化合物-靶点网络图可知, 丹参-红花中 84 个化合物作用于 486 个靶点, 说明了中药治疗疾病时, 多成分、多靶点的特点。化合物-疾病靶点取交集后共得到 28 个靶点, 说明丹参-红花治疗 MI 是多个靶点协同发挥作用的结果。GO 富集分析可知, 丹参-红花治疗 MI 的靶基因涉及 RNA 聚合酶 II 转录因子活性, 配体活化的序列特异性 DNA 结合、细胞因子活性、蛋白质磷酸酶结合等分子功能; 细胞表面、质膜外侧面、胞质等细胞组分; 一氧化氮生物合成过程的正调控、细胞对脂多糖的反应、基因表达阳性调控等生物过程。提示丹参-红花治疗 MI 是通过抑制细胞因子活性, 调控一氧化氮生物途径, 抑制心肌细胞凋亡来实现的。KEGG 结果显示,

35 个通路被富集, $P < 0.01$ 的通路有 21 条。包括缺氧诱导因子信号通路 (HIF-1 signaling pathway)、肿瘤坏死因子信号通路 (TNF signaling pathway)、血管内皮生长因子信号通路 (VEGF signaling pathway)、鞘磷脂类信号通路 (Sphingolipid signaling pathway)、小 G 蛋白 Rap 信号通路 (Rap1 signaling pathway) 等与 MI 有关的通路。

从构建的成分-靶点-信号通路图可知, MAPK14、MAPK1、TNF、PPARG、VEGFA 等靶点拥有较高的度值, 表明这些靶点可能为治疗 MI 的核心靶点。本研究后期通过实验验证了其中 2 个靶点, 证实了丹参-红花对 MI 的治疗作用, 从 HE 染色和 Masson 染色结果可知, 丹参-红花不同剂量组能不同程度的改善心肌病理学状态, Western blotting 结果显示, 丹参-红花低、中、高剂量组可显著减少 TNF- α 和 P38MAPK 的蛋白表达水平 ($P < 0.05$)。实验研究表明^[30-31], TNF- α 的 mRNA 表达量在心肌缺血小鼠模型中表达明显增强, 给药治疗后, TNF- α 水平下降, 缺血损伤也减轻, 提示如果减少 TNF- α 的产生, 并抑制 TNF- α 活化可能会减轻心肌缺血再损伤的发生。

临床研究表明, 在 MI 患者病情发作的 6、12、24、48、72 h 时血清 TNF- α 水平均高于对照组, TNF- α 浓度变化能够反映冠脉病变的程度, 动态监测 TNF- α 的变化对 MI 的严重程度具有一定的预测价值^[32]。研究证实 MI 时, 活性氧 (ROS) 含量的增加伴随着 P38MAPK 的激活, 激活 P38MAPK 可能是 MI 后心肌成纤维细胞迅速增殖的主要原因, 当抑制心肌纤维化时, ROS 及磷酸化的 P38MAPK 表达水平减低。研究显示^[33], 番茄红素抑制 MI 后 P38MAPK 的激活, 可以减少梗死面积, 抑制纤维化。这些报道证实了本研究靶点的预测及验证是可靠的。

综上所述, 本研究应用网络药理学及实验验证的方法对丹参-红花药对的活性成分、靶点和作用通路进行分析并验证了靶点。结果显示, 丹参-红花治疗 MI 是通过多成分、多靶点、多通路的协同作用来发挥药效的, 通过后期实验验证证实了丹参-红花对心肌组织的保护作用, 可看出是多个靶点协同发挥药效的结果。

参考文献

[1] Rothg A, Johnson C, Abajobir A, et al. Global, regional, and national burden of cardiovascular diseases for 10

Causes, 1990 to 2015 [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2017, 70(1): 1-25.

[2] 徐赞晟, 王伊丽, 李 澜, 等. 龙钻颗粒对心肌梗死大鼠心功能及 NF- κ B 介导的炎症反应的影响 [J]. *中草药*, 2018, 49(19): 4586-4590.

[3] Yuan S M, Jing H. Insights into the monomers and single drugs of Chinese herbal medicine on myocardial preservation [J]. *Afric J Tradit Compl Altern Med*, 2010, 8(2): 104-127.

[4] 李淑娇, 唐于平, 沈 娟, 等. 药对研究 (VIII) ——丹参-红花药对 [J]. *中国中药杂志*, 2013, 38(24): 4227-4231.

[5] 高丽娜, 崔元璐, 延 阔, 等. 丹参红花配伍研究进展 [J]. *中草药*, 2016, 47(4): 671-679.

[6] 王小平, 王鹏飞, 白吉庆, 等. 丹参-红花组分配伍对雌、雄性心肌缺血大鼠肝药酶亚型影响的比较研究 [J]. *药物评价研究*, 2017, 40(12): 1711-1716.

[7] 中国药典 [S]. 一部. 2015.

[8] 陈裕琳, 万海同, 周惠芬, 等. 丹参与红花有效成分配伍对大鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用 [J]. *中草药*, 2018, 49(16): 3875-3881.

[9] 王小平, 白吉庆, 胡锦萍, 等. 丹参-红花药对配伍前后对大鼠肝药酶亚型 CYP1A2、CYP2E1 和 CYP3A4 活性的影响 [J]. *药物评价研究*, 2017, 40(3): 300-306.

[10] Liang X, Li H, Li S. A novel network pharmacology approach to analyse traditional herbal formulae: The Liu-Wei-Di-Huang Pill as a case study [J]. *Mol Biosyst*, 2014, 10(5): 1014-1022.

[11] Hopkins A L. Network pharmacology [J]. *Nat Biotechnol*, 2007, 25(10): 1110-1111.

[12] Xu Y, Chen C C, Yang L, et al. Evaluation on hepatotoxicity caused by *Dioscorea bulbifera* based on analysis of bile acids [J]. *Acta Pharm Sin*, 2011, 46(1): 39-44.

[13] Ru J, Li P, Wang J, et al. TCMSP: A database of systems pharmacology for drug discovery from herbal medicines [J]. *J Cheminform*, 2014, 6(13): 1-6.

[14] O'Boyle N M, Banck M, James C A, et al. Open Babel: An open chemical toolbox [J]. *J Cheminform*, 2011, 3(1): 33.

[15] Gfeller D, Aure' lien Grosdidier, Wirth M, et al. Swiss Target Prediction: A web server for target prediction of bioactive small molecules [J]. *Nucleic Acids Res*, 2014, 42(W1): 32-38.

[16] Hamosh A, Scott A F, Amberger J S, et al. Online mendelian inheritance in man (OMIM), a knowledgebase of human genes and genetic disorders [J]. *Nucleic Acids Res*, 2005, 33(1): D514-D517.

- [17] Safran M, Chalifa-Caspi V, Shmueli O, *et al.* Human gene-centric databases at the Weizmann institute of science: Gene Cards, UDB, CroW 21 and HORDE. *Nucleic Acids Res*, 2003, 31(1): 142-146.
- [18] Chen X, Ji Z L, Chen Y Z. TTD: therapeutic target database [J]. *Nucleic Acids Res*, 2002, 30(1): 412-415.
- [19] Maglott D, Pruitt K, Tatusova T, *et al.* *Gene-The NCBI Handbook-NCBI Bookshelf* [M]. 2nd edition. Bethesda: America National Center for Biotechnology Information, 2013.
- [20] 陈路, 李玮玮, 刘春慧. 药对丹参-红花对脑缺血再灌注损伤大鼠脑保护作用的研究 [J]. *中药药理与临床*, 2017, 33(1): 161-166.
- [21] Wei L L, Li W L, Hau R C, *et al.* Sleep-related changes in cardiovascular autonomic regulation in left coronary artery ligation rats: Neural mechanism facilitating arrhythmia after myocardial infarction [J]. *Int J Cardiol*, 2016, 225(15): 65-72.
- [22] Leonie G, Iris B H, Hui L, *et al.* Differences in the association between behavior and neutrophil gelatinase-associated lipocalin in male and female rats after coronary artery ligation [J]. *Physiol Behav*, 2016, 163: 7-16.
- [23] Au-Yeung K K W, Zhu D Y, Karmin O, *et al.* Inhibition of stress-activated protein kinase in the ischemic/reperfused heart: role of magnesium tanshinolate B in preventing apoptosis [J]. *Biochem Pharmacol*, 2001, 62(4): 483-493.
- [24] Yang L M, Xiao Y L, Ouyang J H. Inhibition of magnesium lithospermate B on the c-Jun N-terminal kinase 3 mRNA expression in cardiomyocytes encountered ischemia/reperfusion injury [J]. *Acta Pharm Sin*, 2003, 38(7): 487-491.
- [25] Li H X, Han S Y, Wang X W, *et al.* Effect of the carthamins yellow from *Carthamus tinctorius* L. on hemorheological disorders of blood stasis in rats [J]. *Food Chem Toxicol*, 2009, 47(8): 1797-1802.
- [26] 陈燕, 郑寒松, 高举. 红花黄色素调控 p38MAPK 信号通路保护大鼠糖尿病视网膜神经节细胞的实验研究 [J]. *中草药*, 2019, 50(11): 2639-2644.
- [27] Asgarpanah J, Kazemivash N. Phytochemistry, pharmacology and medicinal properties of *Carthamus tinctorius* L. [J]. *Chin J Integr Med*, 2013, 19(2): 153-159.
- [28] Huang D, Lu Y, Luo X, *et al.* Effect of safflower yellow on platelet activating factor mediated platelet activation in patients with coronary heart disease [J]. *Bangladesh J Pharmacol*, 2012, 7(2): 140-144.
- [29] Zhang L, Liu J G, Shi D Z, *et al.* The protection of active component injection of *Salvia miltiorrhiza* Bge. and *Carthamus tinctorius* L. on myocardial ischemic reperfusion injury in rats [J]. *Chin J Exper Tradit Med Form*, 2009, 15(6): 37-40.
- [30] Sun Y M, Tian Y, Li X, *et al.* Effect of atorvastatin on expression of IL-10 and TNF- α mRNA in myocardial ischemia-reperfusion injury in rats [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009, 382(2): 336-340.
- [31] Wald D S, Kasturiratne A and Bestwick J P. The value of C-reactive protein in screening for future coronary heart disease events [J]. *J Med Screen*, 2009, 16(4): 212-214.
- [32] 蔡民强, 杨利红, 周祥俊, 等. 急性心肌梗死患者血清 c Tn I、TNF- α 、hs-CRP 水平变化及临床意义 [J]. *现代生物医学进展*, 2012, 12(15): 2940-2942.
- [33] Wang X, Lv H, Gu Y W, *et al.* Protective effect of lycopene on cardiac function and myocardial fibrosis after acute myocardial infarction in rats via the modulation of p38 and MMP-9 [J]. *J Mol Hist*, 2013, 45(1): 113-120.