

基于网络药理学的五苓散治疗慢性心力衰竭的机制研究

陈纪焯¹, 张永健¹, 姜萍¹, 周国锋¹, 王永成², 李兆钰¹, 马度芳², 彭波², 李晓^{2*}

1. 山东中医药大学, 山东 济南 250014

2. 山东中医药大学附属医院, 山东 济南 250011

摘要: **目的** 通过网络药理学方法探讨五苓散(WLS)治疗慢性心力衰竭(CHF)的作用机制。**方法** 运用中药系统药理数据库和分析平台(TCMSP)与文献挖掘获取五苓散的有效活性成分和对应的作用靶点,从而建立单味药-活性成分-靶点网络;在GeneCards、OMIM数据库获得CHF的靶点,采用Cytoscape 3.7.1软件构建药物活性成分-CHF-靶点网络模型并进行分析;运用STRING数据库构建蛋白质相互作用网络(PPI),借助DAVID在线工具对关键靶点进行基因本体功能注释(GO)和东京基因组百科全书(KEGG)通路富集分析,并用Surflex软件进行分子对接。**结果** 通过筛选得到50个活性成分,29个潜在靶点,8243个CHF靶点,27个五苓散-CHF共同靶点。网络分析结果表明,五苓散治疗CHF的关键靶点包括CASP3、RELA、AR、ESR1、CHRM1、CASP8等,生物过程主要涉及信号转导、神经系统发育、RNA聚合酶II启动子的转录起始、对雌二醇的反应、胆碱能突触传递等,KEGG富集主要涉及调节神经活性配体-受体相互作用、PI3K-Akt信号通路、胆碱能突触等。分子对接结果显示五苓散中(+)-儿茶素、花旗松素等关键化合物与CASP8、CHRM1、NR3C1等关键靶点有较好的结合能力。**结论** 从网络药理学角度初步揭示了五苓散治疗CHF的物质基础和作用机制,为五苓散的临床应用提供了一定的理论依据。

关键词: 五苓散;慢性心力衰竭;网络药理学;作用机制;信号通路;分子对接;(+)-儿茶素;花旗松素

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2020)20-5220-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.20.14

Mechanism of Wuling Powder in treatment of chronic heart failure based on network pharmacology

CHEN Ji-ye¹, ZHANG Yong-jian¹, JIANG Ping¹, ZHOU Guo-feng¹, WANG Yong-cheng², LI Zhao-yu¹, MA Du-fang², PENG Bo², LI Xiao²

1. Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250014, China

2. Affiliated Hospital of Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250011, China

Abstract: Objective To explore the mechanism of Wuling Powder in the treatment of chronic heart failure (CHF) based on network pharmacology. **Methods** Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology Database (TCMSP) and literature mining were used to search the chemical components and targets of Wuling Powder, and a single drug-active ingredients-target network was established. The related targets of chronic heart failure were collected through Genecards and OMIM databases, the network model of active components-CHF-targets was constructed and analyzed by Cytoscape 3.7.1 software. The protein-protein interaction (PPI) network was constructed by STRING database platform, and the gene oesthetics (GO) function annotation and Kyoto Encyclopedin of Genes and Genomes (KEGG) signal pathway enrichment analysis were performed by DAVID online tools. The molecular docking was performed using Surflex software. **Results** Fifty components, 29 potential targets, 8 243 targets related to chronic heart failure, and 27 targets of Wuling Powder-CHF were obtained. The network analysis results showed that the key targets of Wuling Powder in the treatment of chronic heart failure included CASP3, RELA, AR, ESR1, CHRM1 and CASP8, etc. Biological processes mainly involved signal transduction, nervous system development, transcription initiation from RNA polymerase II promoter in response to estradiol, synaptic transmission, cholinergic synaptic transmission, etc. KEGG enrichment involved neuroactive ligand-receptor

收稿日期: 2020-03-30

基金项目: 国家自然科学基金项目(81673970, 81874449); 全国名老中医药专家丁书文传承工作室建设项目(201059); 山东省重点研发计划项目(2019GSF108024); 国家中医药管理局第四批全国中医(临床、基础)优秀人才研修项目(国中医药教发[2017]24)

作者简介: 陈纪焯(1995—), 男, 硕士研究生, 主要研究方向为心血管疾病的中西医结合诊疗。Tel: (0531)68616009 E-mail: chenjiy037@163.com

*通信作者 李晓(1971—), 男, 博士生导师, 主要研究方向为心血管疾病的中西医结合诊疗, 心肌微血管损伤与自主神经重构研究。

Tel: (0531)68616009 E-mail: lixiao617@163.com

interaction, PI3K-Akt signaling pathway, cholinergic synapse, etc. The molecular docking results showed that (+)-catechin, taxifolin and other key compounds in Wuling Powder had better binding ability with key targets such as CASP8, CHRM1, and NR3C1. **Conclusion** The material basis and mechanism of Wuling Powder in the treatment of chronic heart failure were revealed based on network pharmacology, which provided a certain theoretical basis for the clinical application of Wuling Powder.

Keyword: Wuling Powder; chronic heart failure; network pharmacology; mechanism; signaling pathway; molecular docking; (+)-catechin; taxifolin

慢性心力衰竭 (chronic heart failure, CHF) 是指由于心脏结构或功能异常所导致的心脏充盈或泵血功能受损的一种临床综合征。CHF 的患病率高, 预后较差^[1]。目前西医学治疗 CHF 主要使用 β 受体阻滞剂、血管紧张素转化酶抑制剂等药物, 易产生电解质紊乱、心律失常等不良反应, 且价格昂贵, 会进一步加重患者的经济负担^[2]。相比之下, 中医学注重整体观念、辨证论治, 且中药不良反应小, 治疗 CHF 安全有效。

CHF 归属于中医“心悸”“水肿”等范畴, 病机属于本虚标实, 多以气虚、阳虚为本, 痰饮、水湿、瘀血等病理因素互结为标; 其证型多样、病症繁杂, CHF 后期肾阳受损, 膀胱气化功能失调, 不能蒸化水液, 从而导致阳虚水泛证。五苓散首见于《伤寒论》, 为治疗“太阳蓄水证”的经典方剂, 全国名老中医丁书文教授临床上常用五苓散治疗 CHF, 疗效显著^[3]。该方由猪苓、茯苓、泽泻、白术、桂枝 5 味中药组成, 方中茯苓、猪苓性甘淡, 具利水渗湿之效, 共为君药; 泽泻味甘、淡, 性寒, 通利水道, 为臣药; 白术其味甘、苦, 性温, 健脾燥湿, 为佐药; 桂枝味辛, 性温, 温阳化气以助湿邪从小便而去; 全方标本兼顾, 共奏温阳化气、利水渗湿之效。虽然临床研究表明五苓散可改善 CHF 患者的心功能和临床症状, 提高生活质量^[4], 但由于缺乏基于中医整体观念对五苓散治疗 CHF 作用机制的阐明, 五苓散在临床的推广和应用受到极大的阻碍。

网络药理学通过整合大量网络数据库资源, 利用生物信息学技术, 构建药物-靶点-疾病的整体网络关系, 从而可以从微观到宏观层面上阐释药物多途径、多靶点治疗疾病的调节机制, 与中医的整体观念一致^[5-6]。因此本研究通过网络药理学方法筛选五苓散治疗 CHF 的活性成分及作用靶点, 建立相关网络, 分析五苓散治疗 CHF 的物质基础和作用机制。

1 材料与方法

1.1 五苓散化学成分信息及靶点获取

中药系统药理学数据库和分析平台 (TCMSP) (<http://ibts.hkbu.edu.hk/LSP/tcmsp.php>) 是一个系统

的中药药理学平台。借助 TCMSP 可以获取五苓散中各味中药的化学成分, 依据中药成分 ADME 信息筛选有效成分, 筛选标准为: OB 值 (oral bioavailability) $\geq 30\%$ 和 DL 值 (drug-likeness) ≥ 0.18 ^[7]。同时查阅文献, 综合考虑该化学成分的含量以及生物学效应等多方面因素, 最终确定其活性成分, 并通过 TCMSP 数据库预测其靶点蛋白。在 Uniprot 数据库 (<https://www.uniprot.org/>) 中将靶点蛋白名转换为靶点基因名。

1.2 “单味药-活性成分-作用靶点”网络的构建

把在五苓散中筛选出的活性成分和相关的靶点导入 Cytoscape3.7.1 软件中, 构建“单味药-活性成分-作用靶点”网络, 以阐述五苓散的物质基础。

1.3 CHF 靶点的检索

在 GeneCards 数据库 (<https://www.genecards.org/>)、OMIM 数据库 (<https://www.omim.org/>) 中检索与 CHF 相关的疾病靶点, 将数据库中的疾病靶点导入 excel 表格中合并数据, 剔除重合基因条目, 最终获得 CHF 疾病靶点。取五苓散相关的作用靶点与 CHF 疾病靶点的交集, 获得五苓散干预 CHF 的潜在作用靶点。

1.4 五苓散活性成分-CHF-靶点网络的构建

将交集靶点与五苓散的活性成分导入 Cytoscape 3.7.1 软件中, 利用软件功能构建活性成分-CHF-靶点的网络作用图, 在网络中单味药种类、活性成分和靶点由节点表示, 节点之间的相互关系由边表示。

1.5 蛋白相互作用 (PPI) 网络的构建

STRING 数据库 (<https://string-db.org/>) 是一个用来分析已知蛋白质和预测蛋白质之间相互作用的数据库^[8]。将筛选得到的交集靶点在 STRING 数据库中构建蛋白相互作用网络模型, 选择物种为“homo sapiens”, 设定最低相互作用阈值为中等置信度“Medium confidence”0.4, 其余参数保持默认设置, 最终获得蛋白相互作用网络图。

1.6 GO 富集分析与 KEGG 富集分析

DAVID 数据库 (<https://david.ncicrf.gov/>) 是一个常用的生物信息学工具^[9]。把筛选得到的交集靶点输入 DAVID 数据库中进行 GO 富集分析 (包括

生物过程、细胞组分、分子功能)和 KEGG 信号通路分析。通过 GO 富集分析得到 3 个部分绘制环形图。通过 KEGG 通路富集分析,获取五苓散治疗 CHF 相关的通路,并绘制 KEGG 气泡图,节点的大小表示富集到的靶点数量, P 值越小表示该条信号通路的可信度越高。

1.7 分子对接验证

将筛选得到的 Degree 前 10 的核心靶点与相应活性成分以及临床常用治疗药物进行分子对接验证。从 Uniprot 数据库 (<http://www.uniprot.org/>) 和 PDB 数据库 (<https://www.rcsb.org/>) 中搜索靶点蛋白的 PDB ID 并下载相关文件,同时在 Pubchem 数

据库下载相关活性成分的三维结构文件,将受体和配体信息导入 Surflex 对接软件,进行分子对接。

2 结果

2.1 五苓散活性成分筛选结果

通过 TCMSP 数据库和文献检索^[10-11],收集五苓散的化合物基本信息,根据 OB 和 DL 值筛选得到猪苓有效活性成分 11 个,茯苓有效活性成分 15 个,泽泻有效活性成分 10 个,白术有效活性成分 7 个,桂枝有效活性成分 7 个,见表 1。检索出 50 个主要活性成分,共获得 146 个作用靶点蛋白,通过 Uniprot 数据库进行标准化处理,汇总去重后得到 29 个唯一靶点基因。

表 1 五苓散中化合物的基本信息

Table 1 Basic information on active compounds of Wuling Powder

编号	化合物名称	OB/%	DL	来源
MOL000279	cerevisterol	37.96	0.77	猪苓、茯苓
MOL000282	ergosta-7,22E-dien-3 β -ol	43.51	0.72	猪苓、茯苓
MOL000796	(22E,24R)-ergosta-6-en-3 β ,5 α ,6 β -triol	30.20	0.76	猪苓
MOL000797	(22E,24R)-ergosta-7,22-dien-3-one	49.60	0.31	猪苓
MOL000798	ergosta-7,22-diene-3 β -ol	43.51	0.72	猪苓
MOL000801	5 α ,8 α -epidioxy-(22E,24R)-ergosta-6,22-dien-3 β -ol	44.39	0.82	猪苓
MOL011169	peroxyergosterol	44.39	0.82	猪苓、桂枝
MOL000816	ergosta-7,22-dien-3-one	44.88	0.72	猪苓
MOL000817	ergosta-5,7,22-trien-3-ol	46.18	0.72	猪苓
MOL000820	polyporusterone E	45.71	0.85	猪苓
MOL000822	polyporusterone G	33.43	0.81	猪苓
MOL000273	(2R)-2-[(3S,5R,10S,13R,14R,16R,17R)-3,16-dihydroxy-4,4,10,13,14-pentamethyl-2,3,5,6,12,15,16,17-octahydro-1H-cyclopenta[a]phenanthren-17-yl]-6-methylhept-5-enoic acid	30.93	0.81	茯苓
MOL000275	trametenolic acid	38.71	0.80	茯苓
MOL000276	7,9(11)-dehydropachymic acid	35.11	0.81	茯苓
MOL000280	(2R)-2-[(3S,5R,10S,13R,14R,16R,17R)-3,16-dihydroxy-4,4,10,13,14-pentamethyl-2,3,5,6,12,15,16,17-octahydro-1H-cyclopenta[a]phenanthren-17-yl]-5-isopropyl-hex-5-enoic acid	31.07	0.82	茯苓
MOL000283	ergosterol peroxide	40.36	0.81	茯苓
MOL000285	(2R)-2-[(5R,10S,13R,14R,16R,17R)-16-hydroxy-3-keto-4,4,10,13,14-pentamethyl-1,2,5,6,12,15,16,17-octahydrocyclopenta[a]phenanthren-17-yl]-5-isopropyl-hex-5-enoic acid	38.26	0.82	茯苓
MOL000287	3 β -hydroxy-24-methylene-8-lanostene-21-oic acid	38.70	0.81	茯苓
MOL000289	pachymic acid	33.63	0.81	茯苓
MOL000290	poricoic acid A	30.61	0.76	茯苓
MOL000291	poricoic acid B	30.52	0.75	茯苓
MOL000292	poricoic acid C	38.15	0.75	茯苓
MOL000296	hederagenin	36.91	0.75	茯苓
MOL000300	dehydroeburicoic acid	44.17	0.83	茯苓
MOL000359	sitosterol	36.91	0.75	泽泻、桂枝
MOL000830	alisol B	34.47	0.82	泽泻
MOL000831	alisol B monoacetate	35.58	0.81	泽泻
MOL000832	alisol,b,23-acetate	32.52	0.82	泽泻
MOL000849	16 β -methoxyalisol B monoacetate	32.43	0.77	泽泻

续表 1

编号	化合物名称	OB/%	DL	来源
MOL000853	alisol B	36.76	0.82	泽泻
MOL000854	alisol C	32.70	0.82	泽泻
MOL000856	alisol C monoacetate	33.06	0.83	泽泻
MOL002464	1-monolinolein	37.18	0.30	泽泻
MOL000862	[(1 <i>S</i> ,3 <i>R</i>)-1-[(2 <i>R</i>)-3,3-dimethyloxiran-2-yl]-3-[(5 <i>R</i> ,8 <i>S</i> ,9 <i>S</i> ,10 <i>S</i> ,11 <i>S</i> ,14 <i>R</i>)-11-hydroxy-4,4,8,10,14-pentamethyl-3-oxo-1,2,5,6,7,9,11,12,15,16-decahydrocyclopenta[<i>a</i>]phenanthren-17-yl]butyl] acetate	35.58	0.81	泽泻
MOL000020	12-senecioidiol-2 <i>E</i> ,8 <i>E</i> ,10 <i>E</i> -atractylentriol	62.40	0.22	白术
MOL000021	14-acetyl-12-senecioidiol-2 <i>E</i> ,8 <i>E</i> ,10 <i>E</i> -atractylentriol	60.31	0.31	白术
MOL000022	14-acetyl-12-senecioidiol-2 <i>E</i> ,8 <i>Z</i> ,10 <i>E</i> -atractylentriol	63.37	0.30	白术
MOL000028	α -amyrin	39.51	0.76	白术
MOL000033	(3 <i>S</i> ,8 <i>S</i> ,9 <i>S</i> ,10 <i>R</i> ,13 <i>R</i> ,14 <i>S</i> ,17 <i>R</i>)-10,13-dimethyl-17-[(2 <i>R</i> ,5 <i>S</i>)-5-propan-2-yl-octan-2-yl]-2,3,4,7,8,9,11,12,14,15,16,17-dodecahydro-1 <i>H</i> -cyclopenta[<i>a</i>]phenanthren-3-ol	36.23	0.78	白术
MOL000049	3 β -acetoxyatractylone	54.07	0.22	白术
MOL000072	8 β -ethoxy atractylenolide III	35.95	0.21	白术
MOL001736	(-)-taxifolin	60.51	0.27	桂枝
MOL000358	β -sitosterol	36.91	0.75	桂枝
MOL000492	(+)-catechin	54.83	0.24	桂枝
MOL000073	ent-epicatechin	48.96	0.24	桂枝
MOL004576	taxifolin	57.84	0.27	桂枝

2.2 五苓散活性成分以及相应靶点的网络图

运用 Cytoscape 3.7.1 构建五苓散活性成分以及相应靶点的网络图, 见图 1, 外圈表示药物靶点, 内圈表示活性成分, 每条边代表活性成分与靶点间的相互作用关系。结果表明, 常春藤皂苷元、 β -谷甾醇、3 β -乙酰化苍术酮、花旗松素、谷甾醇、过氧麦角甾醇、(+)-儿茶素、麦角甾-5,7,22-三烯-3-醇等主要成分连接的靶点较多, 与 CHRM1、NR3C1、PGR 等潜在靶点相互作用密切, 这为进一步研究五苓散的药理机制提供了参考。

2.3 CHF 疾病靶点预测结果

在 GeneCards 数据库和 OMIM 数据库中分别以“chronic heart failure”为关键词检索 CHF 靶点, 将数据库中的 CHF 疾病相关靶点合并并剔除重合项, 最终获得与 CHF 相关的疾病靶点 8 243 个。

2.4 网络构建及结果分析

将 29 个化合物靶点基因与 8 243 个 CHF 靶点基因取交集, 得到共同靶点基因 27 个。借助软件 Cytoscape 3.7.1 构建五苓散靶标与 CHF 相互作用网络, 见图 2。六边形代表疾病, 正三角形节点代表有效活性成分, 倒三角形节点表示主要靶点, 节点间互相作用关系用边表示。结果可以看出五苓散能够通过多成分、多靶点联合调节的方式治疗 CHF。

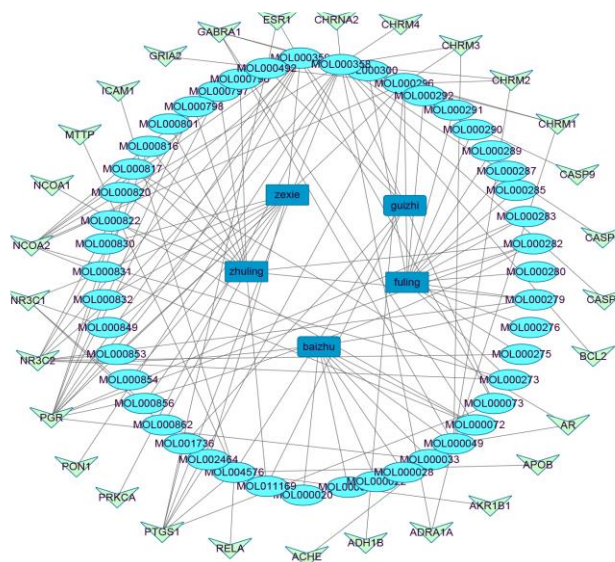


图 1 五苓散活性成分对应靶点相互作用网络图

Fig. 1 Active ingredients-target interaction network diagram of Wuling Powder

2.5 PPI 网络的构建结果

将获得的 27 个共同靶点上传 STRING 数据库, 构建蛋白相互作用网络, 见图 3。图中节点表示蛋白, 边表示功能相关性, 共涉及 27 个节点, 65 条边, 平均节点数为 4.81, 平均局部聚类系数为 0.57。通过基因相互连接次数, 选取 Degree 值较高的为核心基

因，前 10 位分别为：半胱氨酸蛋白酶 3 (CASP3)、转录因子 p65 (RELA)、雄激素受体 (AR)、雌激素受体 1 (ESR1)、胆碱能受体 M1 (CHRM1)、半胱氨酸蛋白酶 8 (CASP8)、糖皮质激素受体 (NR3C1)、孕激素受体 (PGR)、乙酰胆碱酯酶 (ACHE)、B 细胞淋巴瘤/白血病-2 基因 (Bcl-2)，这 10 个靶点作为五苓散治疗 CHF 的关键靶点，同时也是调节心脏结构与功能的关键因子。

2.6 GO 富集分析结果

将共同靶点导入 DAVID 数据库进行 GO 功能分析。GO 功能分析共得到 $P < 0.05$ 的 89 个富集结果，其中生物过程 51 项，主要涉及信号转导、神经系统发育、RNA 聚合酶 II 启动子的转录起始、对雌二醇的反应、胆碱能突触传递等；细胞组成 15 项，

主要涉及膜、核质、细胞连接、突触后膜、突触等；分子功能 23 项，主要涉及序列特异性 DNA 结合、酶结合、转录激活子活性、乙酰胆碱结合等。根据 P 值进行排序，分别在生物过程、分子功能和细胞组分中选出排名前 10 的条目，见图 4。

2.7 KEGG 通路富集分析结果

利用 DAVID 数据库进行 KEGG 通路富集分析，并将 P 值设置为 < 0.05 ，筛选出与五苓散干预 CHF 相关的信号通路。KEGG 富集结果显示，核心靶点涉及神经活性配体-受体相互作用、PI3K-Akt 信号通路、胆碱能突触、钙信号通路、细胞凋亡、cAMP 信号通路、TNF 信号通路、p53 信号通路、NF- κ B 信号通路、心肌细胞的肾上腺素信号传导等通路，见图 5。前 10 条 KEGG 通路及其相关信息见表 2。

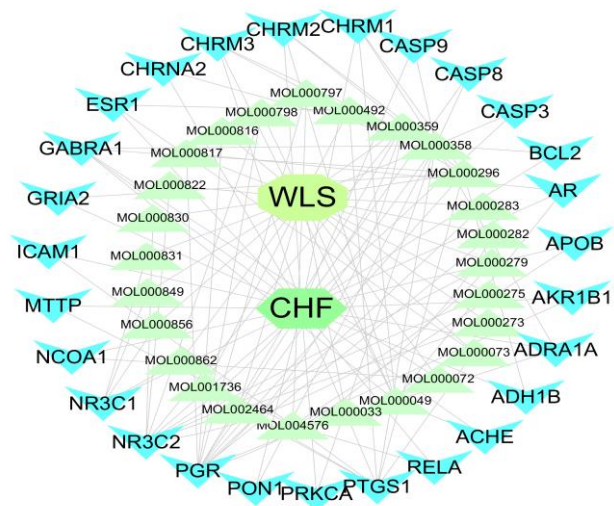


图 2 五苓散靶标与 CHF 相互作用网络图

Fig. 2 Targets-CHF interaction network diagram of Wuling Powder

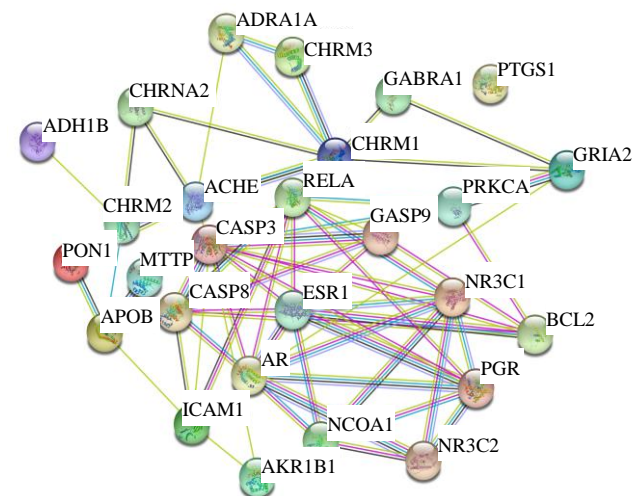


图 3 五苓散靶点蛋白的 PPI 网络

Fig. 3 PPI network of Wuling Powder target protein

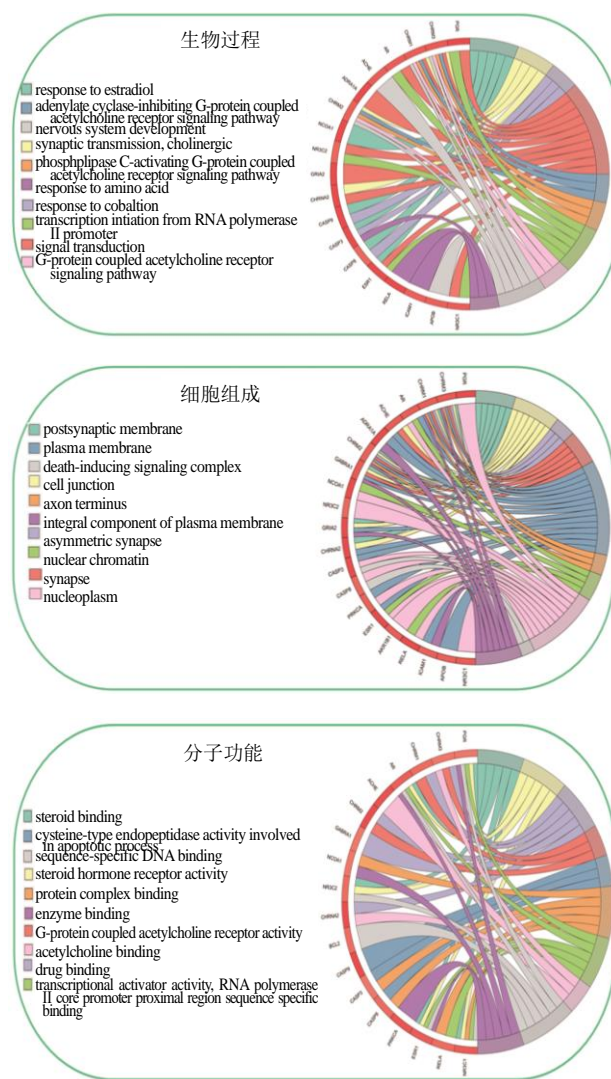


图 4 五苓散治疗 CHF 潜在核心靶点的 GO 富集分析

Fig. 4 GO enrichment analysis of key potential targets against CHF of Wuling Powder

2.8 分子对接验证

为了进一步研究五苓散中活性成分与关键靶点的结合能力，利用分子对接技术进行系统对接。Degree 排名前 10 的关键靶点为 CASP3、RELA、AR、ESR1、CHRM1、CASP8、NR3C1、PGR、ACHE、Bcl-2，将以上靶点与相应的活性成分及临床用药等进行分子对接，对接结果如图 6、7 所示。

从分子对接分数可以判断活性成分与关键靶点的结合程度。总分 > 5.0 表明活性成分与靶点有较好的结合活性，总分 > 7.0 表明分子与靶点的结合构型具有强烈的结合活性^[12]。同时与《慢性心力衰竭基层诊疗指南（2019 年）》^[1]中推荐的缬沙坦、坎地沙坦、伊伐布雷定、卡托普利、依那普利、美托洛尔、曲美他嗪、呋塞米相比，(+)儿茶素、β-谷甾醇、花旗松素也显示出较强的结合能力。特别是(+)儿茶素与关键靶点中的 CASP8、CHRM1、NR3C1 具有良好的结合活性，β-谷甾醇与 ESR1 具有良好

的结合活性。上述结果验证了网络药理学研究结果的可靠性。

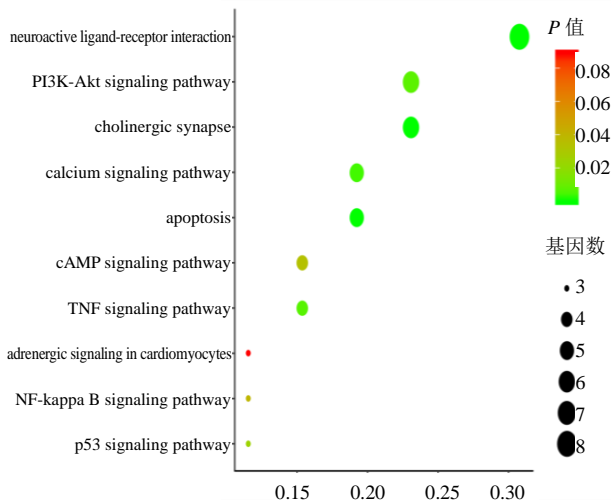


图 5 五苓散治疗 CHF 潜在核心靶点的 KEGG 富集分析
Fig.5 KEGG analysis of key potential targets against CHF of Wuling Powder

表 2 前 10 条 KEGG 通路分析表

Table 2 Top 10 KEGG pathway analysis table

编号	通路	基因数	基因
hsa04080	neuroactive ligand-receptor interaction	8	GABRA1、GRIA2、CHRM3、CHRM2、CHRM1、ADRA1A、NR3C1、CHRNA2
hsa04725	cholinergic synapse	6	PRKCA、ACHE、CHRM3、CHRM2、CHRM1、BCL2
hsa04210	apoptosis	5	CASP3、CASP9、RELA、BCL2、CASP8
hsa04020	calcium signaling pathway	5	PRKCA、CHRM3、CHRM2、CHRM1、ADRA1A
hsa04668	TNF signaling pathway	4	ICAM1、CASP3、RELA、CASP8
hsa04151	PI3K-Akt signaling pathway	6	PRKCA、CASP9、CHRM2、RELA、CHRM1、BCL2
hsa04115	p53 signaling pathway	3	CASP3、CASP9、CASP8
hsa04064	NF-kappa B signaling pathway	3	ICAM1、RELA、BCL2
hsa04261	adrenergic signaling in cardiomyocytes	3	PRKCA、BCL2、ADRA1A
hsa04024	cAMP signaling pathway	4	GRIA2、CHRM2、RELA、CHRM1

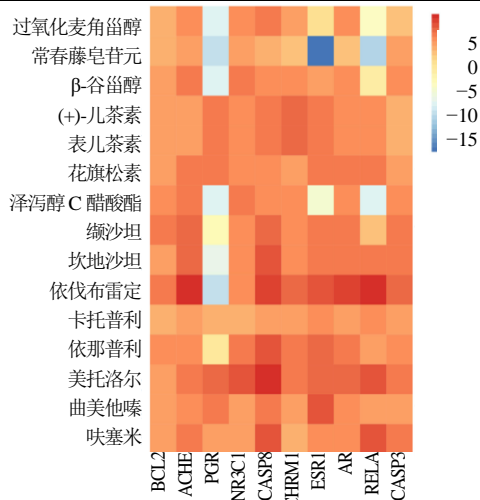


图 6 分子对接热图

Fig. 6 Molecular docking heat map

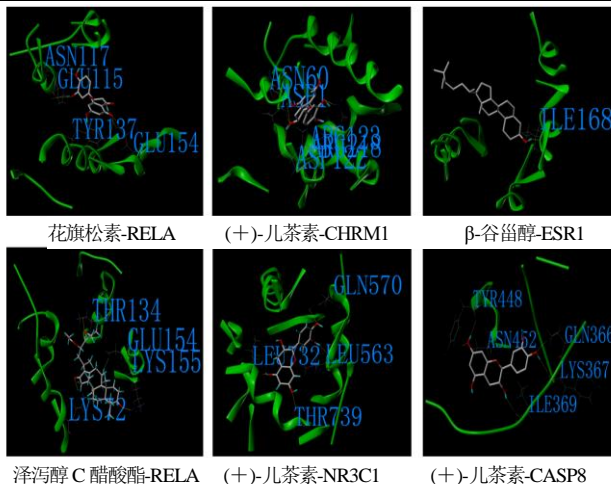


图 7 分子对接模式图

Fig. 7 Molecular docking mode diagram

3 讨论

CHF 患者发病率高,死亡率高。目前认为,神经内分泌的过度激活和心室重构是 CHF 发生发展的关键病理机制^[13]。中医认为,CHF 多伴有气虚阳衰,主要病机多为心肾阳气虚衰、气化不利,导致痰饮、瘀血、水湿内停。针对这种病因病机,治宜温阳益气、化痰利水,因此五苓散治疗 CHF 具备中医理论基础的支持。为了阐明五苓散对 CHF 的治疗作用,本研究应用网络药理学方法对五苓散的有效成分和作用机制进行了综合分析。

本研究通过综合分析五苓散活性成分网络和分子对接,发现五苓散中关键化合物主要为常春藤皂苷元、 β -谷甾醇、 3β -乙酸化苍术酮、花旗松素、谷甾醇、过氧麦角甾醇、(+)-儿茶素等。 β -谷甾醇主要通过降低胆固醇、调节内皮功能、提高抗氧化能力发挥对心血管的保护作用^[14]。常春藤皂苷元能够抑制 IKK β /NF- κ B 信号通路,减轻炎症反应,从而改善冠状动脉血流动力学,调节血管内皮失衡^[15]。现代药理学研究表明麦角甾醇具有利尿、抗炎、降低胆固醇、预防心血管疾病的作用^[16]。(+)儿茶素具有抗炎、抗氧化、保护心肌的作用^[11]。花旗松素能够通过抗氧化应激损伤,发挥对心肌细胞的保护作用^[10]。在五苓散治疗 CHF 的过程中,以上化合物发挥了重要作用。

PPI 网络结果显示,五苓散治疗 CHF 的关键靶点主要有 CASP3、RELA、AR、ESR1、CHRM1、CASP8、NR3C1、PGR、ACHE、Bcl-2 等。CASP3 是细胞凋亡中关键的蛋白酶,在细胞凋亡蛋白酶级联反应中处于核心地位^[17]。RELA 是 NF- κ B 家族中的成员之一,正常状态下胞质中的 NF- κ B p65 处于失活状态,当受到炎症因子、药物等外界刺激时,NF- κ B p65 迅速从胞质进入细胞核内,与核内的特定序列结合,从而启动相关基因的转录,Hamid 等^[18]研究表明 NF- κ B p65 的激活会加剧与心力衰竭相关的炎症反应和细胞凋亡。雄激素受体(AR)是一种核转录因子,存在于心肌细胞中的 AR 与雄激素结合,参与心脏的神经内分泌调节、代偿调节和炎症反应等过程^[19]。近年来,雌激素及其受体对心血管的保护作用受到广泛关注,雌激素受体与细胞内的雌激素结合,调节心肌细胞和血管平滑肌细胞的多种功能,尤其对调节女性绝经前心血管系统的稳定发挥着重要的调节作用^[20]。CHRM1 作为毒蕈碱乙酰胆碱受体的亚型之一,能够被乙酰胆碱等神经递质

激活,从而调控炎症因子的释放,改善炎症^[21]。细胞凋亡与心室重构密切相关,Caspase 基因家族和 Bcl-2 基因家族在细胞凋亡过程中发挥重要的作用,陈国梁^[22]研究发现降低 Caspase-8 的表达并上调 Bcl-2 的表达可以抑制心肌细胞凋亡和心肌肥厚。糖皮质激素通过与 GR 结合,激活心脏中 GR 信号通路,能够改善心脏收缩功能,抑制炎症反应^[23]。乙酰胆碱酯酶可以控制胆碱能突触间的神经信息传递,乙酰胆碱酯酶抑制剂通过抑制乙酰胆碱的酶分解,能够增加副交感神经传递,用以治疗神经系统性疾病,Li 等^[24]研究发现,联合使用乙酰胆碱酯酶抑制剂恢复迷走神经张力,可以明显改善心力衰竭大鼠的心功能,提高生存率。综上所述,五苓散可能通过调节上述关键靶点的表达,从而发挥治疗 CHF 的作用。

通过 DAVID 数据库进行 KEGG 信号通路富集分析发现,五苓散治疗 CHF 的关键通路涉及神经活性配体-受体相互作用通路、PI3K-Akt 信号通路、胆碱能突触。神经活性配体-受体相互作用信号通路是质膜上所有与细胞内外信号通路相关的受体和配体的集合,与神经的功能联系最为密切^[25]。PI3K-Akt 信号通路参与心肌细胞凋亡、能量代谢、炎症反应和血管生成等多种生理病理过程,体内外研究均表明调控 PI3K/Akt 信号通路可以明显改善 CHF 大鼠的心室重构^[26]。邓瑜^[27]研究表明抑制胆碱能突触传递、调节自主神经功能失衡,可以显著改善心血管疾病的功能紊乱。然而这些信号通路在五苓散治疗 CHF 中的作用还需进一步的研究去证实。

本研究采用网络药理学的方法,系统阐述了五苓散治疗 CHF 的作用机制,结果表明五苓散治疗 CHF 的主要成分可能是常春藤皂苷元、 β -谷甾醇和(+)-儿茶素等,作用靶点可能是 CASP3、RELA、AR、ESR1、CHRM1、CASP8、NR3C1、PGR、ACHE、Bcl-2 等,其作用通路可能是神经活性配体-受体相互作用通路、PI3K-Akt 信号通路、胆碱能突触等。本研究揭示了五苓散的物质基础及治疗 CHF 的可能作用机制,并挖掘了多个潜在的治疗靶点,在后续研究中,可以通过液相色谱、质谱等方法鉴别五苓散中有效的药物成分,并且对网络药理学筛选出的关键靶点和通路进行验证,从而能够为五苓散的临床应用奠定坚实的基础。

参考文献

- [1] 中华医学会,中华医学会杂志社,中华医学会全科医学分会,等.慢性心力衰竭基层诊疗指南(2019年)

- [J]. 中华全科医师杂志, 2019, 18(10): 936-947.
- [2] Yancy C W, Jessup M, *et al.* 2016 ACC/AHA/HFSA focused update on new pharmacological therapy for heart failure: An update of the 2013 ACCF/AHA guideline for the management of heart failure: a report of the american college of cardiology/american heart association task force on clinical practice guidelines and the heart failure society of america [J]. *Circulation*, 2016, 134(13): 282-293.
- [3] 边玉洁, 李 晓. 丁书文治疗慢性心力衰竭经验 [J]. 实用中医药杂志, 2014, 30(4): 339.
- [4] 何浩强, 王 阶. 五苓散加减方治疗慢性心力衰竭的研究进展 [J]. 世界中西医结合杂志, 2017, 12(4): 589-592.
- [5] 解 静, 高 杉, 李 琳, 等. 网络药理学在中药领域中的研究进展与应用策略 [J]. 中草药, 2019, 50(10): 2257-2265.
- [6] Li S, Ding Q Y. New progress of interdisciplinary research between network toxicology, quality markers and TCM network pharmacology [J]. *Chin Herb Med*, 2019, 11(4): 347-348.
- [7] Xu X, Zhang W, Huang C, *et al.* A novel chemometric method for the prediction of human oral bioavailability [J]. *Int J Mol Sci*, 2012, 13(6): 6964-6982.
- [8] Christian V M, Jensen L J, Berend S, *et al.* STRING: Known and predicted protein-protein associations, integrated and transferred across organisms. [J]. *Nucleic Acids Res*, 2005, 33: D433-D437.
- [9] Huang da W, Sherman B T. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources [J]. *Nat Protoc*, 2009, 4(1): 44-57.
- [10] 曾志辉, 王晓莉, 叶艳琼, 等. 花旗松素对 H9C2 细胞氧化应激保护作用机制研究 [J]. 中国全科医学, 2019, 22(15): 1794-1799.
- [11] 章 琦, 胡立群, 尹长森, 等. 儿茶素对实验性大鼠心力衰竭模型的保护作用 [J]. 安徽医科大学学报, 2014, 49(6): 764-767.
- [12] Grinter S, Zou X Q. Challenges, applications, and recent advances of protein-ligand docking in structure-based drug design [J]. *Molecules*, 2014, 19(7): 10150-10176.
- [13] Metra M, Teerlink J R. Heart failure. [J]. *Lancet*, 2017, 390: 1981-1995.
- [14] Loizou S, Lekakis I, Chrousos G P. Beta-sitosterol exhibits anti-inflammatory activity in human aortic endothelial cells [J]. *Mol Nutr Food Res*, 2010, 54(4): 551-558.
- [15] Xing Y, Hu D, Zhang T. Traditional Chinese medicine and vascular disease [J]. *Evid-Based Compl Alt*, 2015, 2015: 1-2.
- [16] 戴肖东, 张介驰, 韩增华, 等. 十株野生猴头菌菌株的栽培性状及麦角甾醇含量 [J]. 食用菌学报, 2014, 21(3): 45-49.
- [17] Chan Y Y, Chang C S, Chien L H, *et al.* Apoptotic effects of a high performance liquid chromatography (HPLC) fraction of *Antrodia camphorata* mycelia are mediated by down-regulation of the expressions of four tumor-related genes in human non-small cell lung carcinoma A549 cell. [J]. *J Ethnopharmacol*, 2010, 127(3): 652-661.
- [18] Hamid T, Guo S Z, Kingery J R, *et al.* Cardiomyocyte NF- κ B p65 promotes adverse remodelling, apoptosis, and endoplasmic reticulum stress in heart failure [J]. *Cardiovasc Res*, 2011, 89(1): 129-138.
- [19] 翟燕芳, 邓 洁, 王 煜. 雄激素与慢性心力衰竭 [J]. 海南医学, 2011, 22(24): 117-120.
- [20] Iorga A, Umar S, Ruffenach G, *et al.* Estrogen rescues heart failure through estrogen receptor Beta activation [J]. *Biol Sex Differ*, 2018, 9(1): 48.
- [21] 陈晓凤. 胆碱能抗炎通路对大鼠缺血再灌注心肌基因表达的影响 [D]. 长沙: 中南大学, 2009.
- [22] 陈国梁. 参芪扶正注射液对心衰大鼠心肌细胞凋亡的影响及 bcl-2、caspase-8 表达 [D]. 福州: 福建医科大学, 2009.
- [23] Cruz-Topete D, Oakley R H, Carroll N G, *et al.* Deletion of the cardiomyocyte glucocorticoid receptor leads to sexually dimorphic changes in cardiac gene expression and progression to heart failure [J]. *J Am Heart Assoc*, 2019, 8(15): e011012.
- [24] Li M, Zheng C, Kawada T, *et al.* Adding the acetylcholinesterase inhibitor, donepezil, to losartan treatment markedly improves long-term survival in rats with chronic heart failure [J]. *Eur J Heart Fail*, 2014, 16(10): 1056-1065.
- [25] Lauss M, Kriegner A, Vierlinger K, *et al.* Characterization of the drugged human genome [J]. *Pharmacogenomics*, 2007, 8(8): 1063-1073.
- [26] Tham Y K, Bernardo B C, Ooi J Y, *et al.* Pathophysiology of cardiac hypertrophy and heart failure: signaling pathways and novel therapeutic targets [J]. *Arch Toxicol*, 2015, 89(9): 1401-1438.
- [27] 邓 瑜. 中枢过表达 ACE2 降低胆碱能突触传递机制在改善高血压中的作用研究 [D]. 银川: 宁夏医科大学, 2014.