

基于网络药理学及外周血基因芯片技术探究温阳益气活血方治疗慢性心衰的作用机制

吕李飞¹, 吴俊松¹, 苟江腾², 赵成周³, 孙胜男³, 李忠宽⁴, 贾守宁⁴, 祁永福^{4*}

1. 青海大学 青海省糖脂代谢疾病防控中医药重点实验室, 青海 西宁 810016

2. 生物芯片北京国家工程研究中心(博奥生物), 北京 102266

3. 青海大学藏医学院, 青海 西宁 810001

4. 青海省中医院, 青海 西宁 810012

摘要: 目的 基于网络药理学与分子对接技术, 预测名中医方温阳益气活血方治疗慢性心衰的物质基础及作用机制, 通过实验探讨温阳益气活血方对慢性心衰患者外周血基因表达谱的影响, 为中医药治疗慢性心衰的后续研究提供基础与方向。方法 通过中药系统药理学分析平台(TCMSP)筛选温阳益气活血方中潜在活性成分; GEO 数据库获得潜在活性成分的作用靶点; Venny 在线平台获得慢性心衰的主要致病靶点。利用 STRING 数据库和 Cytoscape 软件构建“方药-成分-靶点-疾病”网络模型及蛋白相互作用(protein-protein interaction, PPI)网络图, 分析方药中主要活性成分及作用靶点蛋白; 使用 R 语言的 Cluster Profiler 工具包对方药作用核心靶点进行基因本体论(genetic ontology, GO)及京都基因与基因组百科全书(Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)分析。借助 Autodock 进行分子对接。随机选取 30 例健康志愿者作为对照组。60 例慢性心衰患者入选试验组, 按随机分为化学药组和中西药组, 各组 30 例。化学药组采用盐酸贝那普利片(10 mg/d)、氢氯噻嗪片(50 mg/d)、螺内酯片(40 mg/d)、琥珀酸美托洛尔片(23.75 mg/d)及地高辛片(0.125 mg/d)联合用药, 1 次/d; 中西药组在常规化学药物口服治疗的基础上联合温阳益气活血方颗粒剂, 6 g/次, 2 次/d, 2 组疗程均为 15 d。对照组于清晨空腹安静状态下, 抗凝管采集前臂静脉血, 后随机抽取 10 例外周血用于基因芯片的差异检测; 试验组于入院次日清晨空腹状态下采集, 最后随机抽取 2 组中各 5 例药物干预前后的外周血用于基因芯片的差异检测。采用 Affymetrix 公司的 PrimeView™ Human Gene Expression Array 基因芯片检测, 结合生物信息学的转录组学及 RNA 技术分析温阳益气活血方的差异表达基因。结果 筛选出方药潜在活性成分 6 个和 236 个药物靶点; 得到方药治疗慢性心衰的潜在作用靶点 17 个; 通过 GO 分析得出 519 个生物过程、5 个细胞组分、14 个分子功能; KEGG 通路富集分析得出 89 条信号通路。2 组慢性心衰患者给予不同药物干预后, 中西药组外周血基因表达谱中共检测出 42 640 个基因, 化学药组为 37 081 个基因, 2 种干预方法均能影响慢性心衰外周血的基因表达, 单纯化学药较中西药联合干预改变慢性心衰的差异基因数目少。相关检测指标血清脑钠肽前体(brain natriuretic peptide, BNP)、中医症状积分及心功能疗效也具有统计学差异($P < 0.05$)。结论 初步揭示了温阳益气活血方干预慢性心衰可能是通过多成分、多靶点、多途径发挥防治作用, 其作用机制与 ZNF331、TRAPPC10、SMAD7、MYC、RORA、PCNA 基因相关, 涉及 Th17 细胞分化、B 细胞受体信号通路、腺苷酸活化蛋白激酶(adenosine monophosphate activated protein kinase, AMPK)通路。

关键词: 慢性心衰; 温阳益气活血方; 分子对接; 信号通路; 网络药理学; 基因表达谱芯片

中图分类号: R285 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2021)18-5626-17

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.18.018

Based on network pharmacology and peripheral blood gene chip technology to explore mechanism of Wenyang Yiqi Huoxue Recipe in treatment of chronic heart failure

收稿日期: 2021-03-12

基金项目: 教育部春晖计划项目(Z2017056); 青海省高层次人才(领军人才)项目(2018 年, 2019 年); 青海省中藏医药科研创新项目(J2020005, J2020007); 青海省卫生健康委员会重点项目(2019-wjzd-11); 青海省应用基础研究项目(2016-ZJ-777); 2018 年中医药公共卫生服务补助专项“全国中药资源普查项目”(财社[2018]43 号); 青海省糖脂代谢疾病防控中医药重点实验室开放课题

作者简介: 吕李飞(1994—), 男, 硕士研究生, 研究方向为心血管疾病的中西医结合治疗。Tel: 18073170943 E-mail: Lvlifei940707123@163.com

***通信作者:** 祁永福(1973—), 男, 博士, 主任医师, 硕士生导师, 研究方向为心血管及消化疾病的治疗。

Tel: 13109711899 E-mail: qiyf1999@126.com

LYU Li-fei¹, WU Jun-song¹, GOU Jiang-teng², ZHAO Cheng-zhou³, SUN Sheng-nan³, LI Zhong-kuan⁴, JIA Shou-ning⁴, QI Yong-fu⁴

1. Qinghai Provincial Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Research for Glucolipid Metabolic Diseases, Qinghai University, Xining 810016, China
2. National Engineering Research Center for Beijing Biochip Technology (CapitalBio), Beijing 102266, China
3. Tibetan Medicine College, Qinghai University, Xining 810001, China
4. Qinghai Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Xining 810012, China

Abstract: Objective Based on network pharmacology and molecular docking technology, the material basis and mechanism of Wenyang Yiqi Huoxue Recipe (温阳益气活血方) in the treatment of chronic heart failure were predicted. To explore the effect of Wenyang Yiqi Huoxue Recipe on gene expression profile of peripheral blood in patients with chronic heart failure, so as to provide basis and direction for the follow-up study of traditional Chinese medicine in the treatment of chronic heart failure. **Methods** Based on the pharmacological analysis platform (TCMSP) of traditional Chinese medicine system, the potential active components of Wenyang Yiqi Huoxue Recipe were screened; GEO database was used to obtain the target of potential active components; Venny online platform was used to obtain the main pathogenic target of chronic heart failure. The “formula-component-target-disease” network model and protein-protein interaction (PPI) network diagram were constructed by using STRING database and Cytoscape software to analyze the main active components and target proteins in prescription; Genetic ontology (GO) and Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) were analyzed by Cluster Profiler toolkit of R language. Autodock was used for molecular docking. Thirty healthy subjects were randomly selected as the control group. Experimental group: Sixty patients with chronic heart failure were randomly divided into chemical medicine group and traditional Chinese medicine (TCM) and Western medicine group. The chemical medicine group was treated with Benazepril Hydrochloride Tablets 10 mg/d, Hydrochlorothiazide Tablets 50 mg/d, Spironolactone Tablets 40 mg/d, Metoprolol Succinate Tablets 23.75 mg/d and Digoxin Tablets 0.125 mg/d, 1 time/d; On the basis of oral treatment with conventional chemical drugs, the TCM and Western medicine group was combined with Wenyang Yiqi Huoxue Formula Granules, 6 g/time, 2 times/d. The course of treatment of both groups was 15 d. In the control group, venous blood of forearm was collected by anticoagulant tube in the quiet state of fasting in the morning, and then 10 cases of peripheral blood were randomly selected for differential detection of gene chip. The experimental group was collected on an empty stomach in the morning of the next day after admission, the peripheral blood of five cases in each group was randomly selected for the difference detection of gene chip before and after drug intervention. Affymetrix company’s PrimeView™ Human Gene Expression Array Gene chip was used to detect the reverse differentially expressed genes of Wenyang Yiqi Huoxue Recipe combined with bioinformatics transcriptome and RNA technology. **Results** Six potential active components and 236 drug targets were screened; Seventeen potential targets of prescriptions in the treatment of chronic heart failure were obtained; A total of 519 biological processes, five cell components and 14 molecular functions were obtained by GO analysis; Eighty-nine signal pathways were obtained by KEGG pathway enrichment analysis. Microarray experiment showed that after the two groups of patients with chronic heart failure were given different drugs, a total of 42 640 genes were detected in the gene expression profile of peripheral blood in the TCM and Western medicine group and 37 081 in the chemical medicine group. Both intervention methods can affect the gene expression of peripheral blood of chronic heart failure. The number of differential genes of chronic heart failure changed by single pure chemical drugs was less than that by the combined intervention of Chinese and Western medicine. There were also significant differences in related indexes brain natriuretic peptide (BNP), TCM symptom score and cardiac function ($P < 0.05$). **Conclusion** It is preliminarily revealed that Wenyang Yiqi Huoxue Recipe may play a preventive and therapeutic role in chronic heart failure through multiple components, multiple targets and multiple ways. Its mechanism is related to *ZNF331*, *TRAPPC10*, *SMAD7*, *MYC*, *RORA* and *PCNA* genes, involving Th17 cell differentiation, B cell receptor signal pathway and adenosine monophosphate activated protein kinase (AMPK) pathway.

Key words: chronic heart failure; Wenyang Yiqi Huoxue Recipe; macromolecular docking; signal pathway; network pharmacology; gene expression profiling chip

慢性心力衰竭 (chronic heart failure, CHF) 是指各种心脏结构或功能异常, 致使心室充盈或射血功能受损, 心排量不能满足机体组织代谢需要而

引起的一组综合征, 是多种心血管疾病主要死因。也是各种心血管系统疾病的最终转归, 目前临床主要以神经内分泌调节治疗为主, 如血管紧张素受体

脑啡肽酶抑制剂 (angiotensin receptor neprilysin inhibitor, ARNI) 类药物, 可抑制血管紧张素受体表达和增强利钠肽系统作用^[1]。但究其根本为对症治疗, 长期使用会产生耐药现象。目前 CHF 的病死率和复发率一直逐年增长, 随着人口老龄化不断加剧, 已成为我国主要的公共卫生问题, 给社会经济造成严重负担^[2]。

祖国医学将心衰归为“心水”“怔忡”范畴。西晋王叔和《脉经》提出“肝着其根, 心气因起, 阳行四肢, 肺气亨亨, 喘息则安。”其病理性质属本虚标实, 本虚为心之气血阴阳虚衰, 脏腑功能失调; 标实为痰浊、瘀血、水饮、气滞。心气虚是病理基础, 血瘀是中心环节, 痰饮和水湿是主要的病理产物。据此, 治以温阳益气活血法, 方用温阳益气活血方治疗。

温阳益气活血方是青海省中医院名老中医自拟验方, 由制附子、桂枝、黄芪、人参、熟地黄、当归、白芍、赤芍、川芎、桃仁、红花 11 味中药组成, 具有温阳益气、活血化瘀之功效, 使机体正存邪祛、阴阳乃固, 故临床多用于心血管疾病, 青海省中医院心肾科前期将温阳益气活血方进行临床研究, 有明显临床疗效, 后将其制成颗粒剂, 目前对在院 CHF 患者应用广泛^[3]。但中药复方是一种混合物, 疗效的整体性体现在对人体全方位多靶点方面, 因此从分子水平阐述温阳益气活血方防治 CHF 的作用机制是中药药理学亟待解决的重要问题, 也是基础实验、临床研究获取理论依据的必经之路。网络药理学可整合中药成分与靶标间相互作用关系、靶标与靶标间相互作用关系; 分子对接是预测受体与配体相互作用和反应机制的模拟化手段, 二者联合应用有助于发现中药的潜在机制^[4]。

目前温阳益气活血方改善 CHF 的效应机制尚不明确, 本研究从外周血真核细胞基因表达谱的研究角度, 采用芯片检测 2 种方法干预后, 化学药组与中西药组外周血的差异表达基因, 结合 RNA 的差异表达分析, 初步判断基因表达的关键变化可能改变相关基因功能, 为温阳益气活血方治疗 CHF 的作用机制提供研究资料 and 方向。

1 网络药理学实验

1.1 资料与方法

1.1.1 温阳益气活血方的潜在活性化学成分及靶点收集和筛选 从 TCMSP 数据库, 依次检索白芍、赤芍、川芎等 11 味中药的化学成分, 名称按《中国

药典》2020 年版的植物名称进行规范, 根据化学成分的药理学参数进行筛选, 参考 TCMSP 自设定意见的筛选条件^[5], 通过筛选得到符合条件的潜在活性成分。另外, 结合中国知网、维普、万方、PubMed 等数据库及相关文献对未纳入的潜在化学成分进行补充。

1.1.2 CHF 潜在作用靶点预测及筛选 从 NCBI 平台下的基因表达综合数据库 (gene expression omnibus, GEO) 以“chronic heart failure”为关键词, 选择物种为“homo sapiens”, 研究类型为“expression profiling by array”, 检索 CHF 的基因芯片。选取基因芯片 GSE9128 (包含 3 个正常样本, 样本编号为 GSM231003、GSM231003、GSM231005; 8 个 CHF 样本, 样本编号为 (GS-M231006 ~ GSM231013) 及其平台数据 GPL96 下载后使用 R 软件包, 设定 $P < 0.05$ 和 $|\log_2(\text{fold change, FC})| > 0.5$, 分别绘制热图与火山图。

1.1.3 “中药-成分-交集靶点-疾病”网络的构建 根据以上预测结果, 使用 Cytoscape 3.7.2 软件构建“中药-成分-靶点-疾病”关系网络模型, 节点 (node) 代表单味药种类、潜在活性化合物、共同作用靶点与疾病 (CHF); 边 (edge) 用于连接中药与化合物、化合物与交集靶点、靶点与疾病 (CHF)、疾病 (CHF) 与中药, 展现“中药-化合物-交集靶点-疾病”之间的联系, 寻找发挥重要作用的活性成分^[6]。

1.1.4 蛋白质相互作用 (protein-protein interaction, PPI) 网络的构建 PPI 网络是指从生物化学、信号转导和遗传网络的角度研究化合物和疾病相关蛋白质之间的相关性。将温阳益气活血方治疗 CHF 的潜在作用靶点导入 STRING 数据库 (<https://string-db.org/>), 限定研究物种为“homo sapiens”, 获得 PPI 关系, 导出保存为 TSV 格式文件。将该文件中包含 node1、node2 和 combined score 的信息导入 Cytoscape 3.7.2 软件绘制 PPI 网络^[7], 设置节点的大小代表度 (degree) 值, 节点越大, 表示其度值越大, 最终获得 PPI 网络图。

1.1.5 基因本体论 (genetic ontology, GO) 功能分析和京都基因与基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 通路富集分析 GO 功能富集分析是对差异基因的生物途径进行注释及分类并进行富集统计学分析; KEGG 通路富集分析是东京大学和京都大学共同研制的数据库, 可查询通路^[8]。将温阳益气活血方治疗 CHF

的潜在作用靶点导入 David 数据库, 限定研究物种为“homo sapiens”, 选择 GO 下的分子功能 (molecular function, MF)、生物过程 (biological process, BP) 和细胞组成 (cellular component, CC) 3 个部分进行 GO 富集分析^[9], 选择 pathway 分析下的 KEGG pathway, 设定显著性为 $P < 0.05$, 进一步寻找活性成分作用靶点显著富集的主要功能与体内通路。然后导出文件, 对 P 值取负对数 ($-\lg P$), P 值越小, $-\lg P$ 越大, 富集程度越大, 反之亦然。利用 R 语言的 Cluster Profiler 工具包对 GO 分析和 KEGG 通路富集分析中的通路绘制条形图。

根据上述所得到的核心靶点、GO 通路富集程度前 15、5、13 的信息以及 KEGG 富集程度前 20 的通路导入 Cytoscape3.7.2, 得到“靶点-BP-CC-MF-KEGG”网络。

1.1.6 核心活性成分-靶点分子对接验证 从 RCSB

蛋白质数据库 (<http://www.pdb.org/>) 下载 5 个核心靶点的晶体结构, 去除水分子、加氢后使用 Autodock Tool 4.2 (ADT) 保存为 pdbqt 格式。从 TCMSP 数据库下载 6 个核心成分的 MOL2, 并使用 ChemDraw 3D 软件将其能量最小化, 再导入 ADT 后保存为 pdbqt 格式。采用 Autodock Vina 对 6 个核心成分与 5 个核心靶点进行分子对接验证^[10]。用结合能来评估分子与靶点的结合能力, 结合能 < 0 表明能自发结合, 结合能 ≤ -5 kJ/mol 表明结合良好。

1.2 结果

1.2.1 温阳益气活血方潜在活性化合物筛选

从 TCMSP 数据库, 在口服利用度 (oral bioavailability, OB) $\geq 30\%$ 、类药性 (drug-likeness, DL) ≥ 0.18 ^[5] 条件下, 获取 11 味中药的 138 个有效成分 (表 1), 包括并筛选得到有效成分所对应的 236 个靶点 (剔除重复项后)。

表 1 温阳益气活血方主要活性化合物筛选结果

Table 1 Screening results of main active compounds in Wenyang Yiqi Huoxue Recipe

MOLID	成分	OB/%	DL	归属	MOLID	成分	OB/%	DL	归属
MOL001910	11alpha,12alpha-epoxy-3beta-23-dihydroxy-30-norolean-20-en-28,12beta-olide	64.77	0.38	白芍	MOL002698	lupeol-palmitate	33.98	0.32	红花
MOL001918	paeoniflorone	87.59	0.37	白芍、赤芍	MOL002706	phytoene	39.56	0.50	红花
MOL002776	baicalin	40.12	0.75	赤芍、红花	MOL002707	phytofluene	43.18	0.50	红花
MOL001921	lactiflorin	49.12	0.80	白芍、赤芍	MOL002710	pyrethrin II	48.36	0.35	红花
MOL001924	paeoniflorin	53.87	0.79	白芍、赤芍	MOL002712	6-hydroxykaempferol	62.13	0.27	红花
MOL001925	paeoniflorin_qt	68.18	0.40	白芍、赤芍	MOL002717	qt_carthamone	51.03	0.20	红花
MOL001928	albiflorin_qt	66.64	0.33	白芍	MOL002719	6-hydroxynaringenin	33.23	0.24	红花
MOL001930	benzoyl paeoniflorin	31.27	0.75	白芍	MOL002721	quercetagenin	45.01	0.31	红花
MOL000211	mairin	55.38	0.78	白芍、黄芪	MOL002757	7,8-dimethyl-1H-pyrimido [5,6-g]quinoxaline-2,4-dione	45.75	0.19	红花
MOL000358	beta-sitosterol	36.91	0.75	白芍、赤芍、当归、桂枝、红花、人参、桃仁	MOL002773	beta-carotene	37.18	0.58	红花
MOL000359	sitosterol	36.91	0.75	白芍、赤芍、川芎、附子、桂枝、熟地	MOL000006	luteolin	36.16	0.25	红花
MOL000422	kaempferol	41.88	0.24	白芍、红花、黄芪、人参	MOL000953	CLR	37.87	0.68	红花
MOL000492	(+)-catechin	54.83	0.24	白芍、赤芍、桂枝	MOL000098	quercetin	46.43	0.28	红花、黄芪
MOL001002	ellagic acid	43.06	0.43	赤芍	MOL000239	jaranol	50.83	0.29	黄芪
MOL002714	baicalein	33.52	0.21	赤芍、红花	MOL000296	hederagenin	36.91	0.75	黄芪、桃仁
MOL004355	spinasterol	42.98	0.76	赤芍	MOL000354	isorhamnetin	49.60	0.31	黄芪
MOL000449	stigmasterol	43.83	0.76	赤芍、当归、红花、人参、熟地	MOL000371	3,9-di-O-methylnissolin	53.74	0.48	黄芪
MOL006994	1-O-beta-D-glucopyranosyl-8-O-benzoylpaeoniflorone_qt	36.01	0.30	赤芍	MOL000374	5'-hydroxyiso-muronulatol-2',5'-di-O-glucoside	41.72	0.69	黄芪
MOL006999	stigmast-7-en-3-ol	37.42	0.75	赤芍	MOL000378	7-O-methylisomucronulatol	74.69	0.30	黄芪
MOL007003	benzoyl paeoniflorin	31.14	0.54	赤芍	MOL006992	(2R,3R)-4-methoxyl-distylin	59.98	0.30	赤芍
					MOL006990	(1S,2S,4R)-trans-2-hydroxy-1,8-cineole-beta-D-glucopyranoside	30.25	0.27	赤芍
					MOL000379	9,10-dimethoxypterocarpan-3-O-beta-D-glucoside	36.74	0.92	黄芪
					MOL000387	bifendate	31.10	0.67	黄芪
					MOL000392	formononetin	69.67	0.21	黄芪

续表 1

MOLID	成分	OB/%	DL	归属	MOLID	成分	OB/%	DL	归属
MOL007004	albiflorin	30.25	0.77	赤芍	MOL000398	isoflavanone	109.90	0.30	黄芪
MOL007005	albiflorin_qt	48.70	0.33	赤芍	MOL000417	calycosin	47.75	0.24	黄芪
MOL007008	4-ethyl-paeoniflorin_qt	56.87	0.44	赤芍	MOL000438	(3 <i>R</i>)-3-(2-hydroxy-3,4-dimethoxyphenyl) chroman-7-ol	67.67	0.26	黄芪
MOL007012	4- <i>O</i> -methyl-paeoniflorin_qt	56.70	0.43	赤芍	MOL000439	isomucronulatol-7,2'-di- <i>O</i> -glucosiole	49.28	0.62	黄芪
MOL007014	8-debenzoylpaeonidanin	31.74	0.45	赤芍	MOL000442	1,7-dihydroxy-3,9-dimethoxy pterocarpene	39.05	0.48	黄芪
MOL007016	paeoniflorigenone	65.33	0.37	赤芍	MOL002879	diop	43.59	0.39	人参
MOL007018	9-ethyl-neo-paeoniaflorin A_qt	64.42	0.30	赤芍	MOL003648	inermin	65.83	0.54	人参
MOL007022	evofolinB	64.74	0.22	赤芍	MOL004492	chrysanthemaxanthin	38.72	0.58	人参
MOL007025	isobenzoylpaeoniflorin	31.14	0.54	赤芍	MOL005308	aposiopolamine	66.65	0.22	人参
MOL002883	ethyl oleate (NF)	32.4	0.19	赤芍	MOL005314	celabenzine	101.80	0.49	人参
MOL005043	campest-5-en-3beta-ol	37.58	0.71	赤芍	MOL005317	deoxyharringtonine	39.27	0.81	人参
MOL001494	mandenol	42.00	0.19	川芎	MOL005318	dianthramine	40.45	0.20	人参
MOL002135	myricanone	40.60	0.51	川芎	MOL005320	arachidonate	45.57	0.20	人参
MOL002140	perlolyrine	65.95	0.27	川芎	MOL005321	frutinone A	65.90	0.34	人参
MOL002151	senkyunone	47.66	0.24	川芎	MOL005344	ginsenoside rh ₂	36.32	0.56	人参
MOL002157	wallichilide	42.31	0.71	川芎	MOL005348	ginsenoside-Rh ₄ _qt	31.11	0.78	人参
MOL000433	FA	68.96	0.71	川芎、黄芪	MOL005356	girinimbin	61.22	0.31	人参
MOL002211	11,14-eicosadienoic acid	39.99	0.20	附子	MOL005357	gomisin B	31.99	0.83	人参
MOL002388	delphin_qt	57.76	0.28	附子	MOL005360	malkangunin	57.71	0.63	人参
MOL002392	deltoin	46.69	0.37	附子	MOL005376	panaxadiol	33.09	0.79	人参
MOL002393	demethyldeLavaine A	34.52	0.18	附子	MOL005384	suchilactone	57.52	0.56	人参
MOL002394	demethyldeLavaine B	34.52	0.18	附子	MOL005399	alexandrin_qt	36.91	0.75	人参
MOL002395	deoxyandrographolide	56.30	0.31	附子	MOL005401	ginsenoside Rg ₅ _qt	39.56	0.79	人参
MOL002397	karakoline	51.73	0.73	附子	MOL000787	fumarine	59.26	0.83	人参
MOL002398	karanjin	69.56	0.34	附子	MOL001323	sitosterol alphaI	43.28	0.78	桃仁
MOL002401	neokadsuranic acid B	43.10	0.85	附子	MOL001328	2,3-didehydro GA70	63.29	0.50	桃仁
MOL002406	2,7-dideacetyl-2,7-dibenzoyl-taxayunnanin F	39.43	0.38	附子	MOL001329	2,3-didehydro GA77	88.08	0.53	桃仁
MOL002410	benzoylnapelline	34.06	0.53	附子	MOL001339	GA119	76.36	0.49	桃仁
MOL002415	6-demethyl-desoline	51.87	0.66	附子	MOL001340	GA120	84.85	0.45	桃仁
MOL002416	deoxyaconitine	30.96	0.24	附子	MOL001342	GA121-isolactone	72.70	0.54	桃仁
MOL002419	(<i>R</i>)-norcoclaurine	82.54	0.21	附子	MOL001343	GA122	64.79	0.50	桃仁
MOL002421	ignavine	84.08	0.25	附子	MOL001344	GA122-isolactone	88.11	0.54	桃仁
MOL002422	isotalatizidine	50.82	0.73	附子	MOL001348	gibberellin 17	94.64	0.49	桃仁
MOL002423	jesaconitine	33.41	0.19	附子	MOL001349	CA30	61.72	0.54	桃仁
MOL002434	carosifloside I_qt	38.16	0.80	附子	MOL001351	gibberellin A44	101.61	0.54	桃仁
MOL000538	hypaconitine	31.39	0.26	附子	MOL001352	GA54	64.21	0.53	桃仁
MOL001736	(-)-taxifolin	60.51	0.27	桂枝	MOL001353	GA60	93.17	0.53	桃仁
MOL000073	ent-epicatechin	48.96	0.24	桂枝	MOL001355	GA63	65.54	0.54	桃仁
MOL004576	taxifolin	57.84	0.27	桂枝	MOL001358	gibberellin 7	73.80	0.50	桃仁
MOL011169	peroxyergosterol	44.39	0.82	桂枝	MOL001360	GA77	87.89	0.53	桃仁
MOL001771	poriferast-5-en-3beta-ol	36.91	0.75	红花	MOL001361	GA87	68.85	0.57	桃仁
MOL002680	flavoxanthin	60.41	0.56	红花	MOL001368	3- <i>O</i> - <i>p</i> -coumaroylquinic acid	37.63	0.29	桃仁
MOL002694	4-[(<i>E</i>)-4-(3,5-dimethoxy-4-oxo-1-cyclohexa- 2,5-dienylidene)but-2-enylidene]-2,6-dimeth oxycyclohexa-2,5-dien-1-one	48.47	0.36	红花	MOL001371	populoside_qt	108.89	0.20	桃仁
MOL002695	lignan	43.32	0.65	红花	MOL000493	campesterol	37.58	0.71	桃仁

1.2.2 CHF 潜在作用靶点 从 GSE9128 中获得 395 个差异基因 (176 个上调、219 个下调), 选择上调基因和下调基因各 20 个绘制热图 (图 1), 其中 C 代表正常组, T 代表 CHF 组。所有差异基因绘制火山图 (图 2), 红色代表上调基因, 绿色代表下调基因, 黑色代表无显著性差异的基因。

1.2.3 交集靶点的获取 通过 venny 在线平台 (<https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index2.0.2.html>), 在 sheet1 输入成分靶点, sheet2 输入 CHF 的差异基因, 获取中药治疗 CHF 的 17 个交集靶点。

将中药、成分、交集靶点及疾病导入 Cytoscape 进行“中药-成分-交集靶点-疾病”网络的构建。并通过 Cytoscape 分析得到编号为 MOL000098、MOL000358、MOL000422、MOL000006、MOL000449、MOL002714 的成分度值最大, 为核心成分 (图 3), 分别是槲皮素 (quercetin)、 β -谷甾醇 (beta-sitosterol)、山柰酚 (kaempferol)、木犀草素 (luteolin)、豆甾醇 (stigmasterol)、黄芩素 (baicalein), 为温阳益气活血方筛选出的 6 个改善 CHF 的潜在核心活性成分。



图 1 差异基因热图

Fig. 1 Thermal maps of differential genes

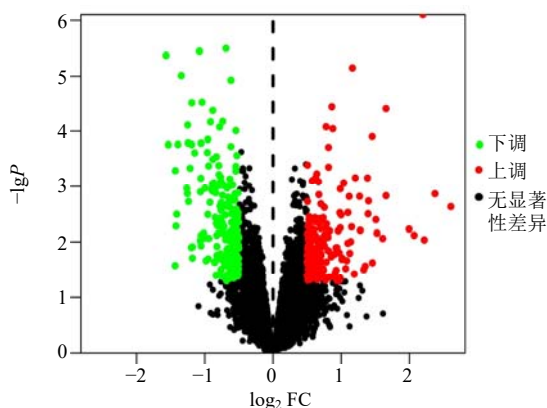
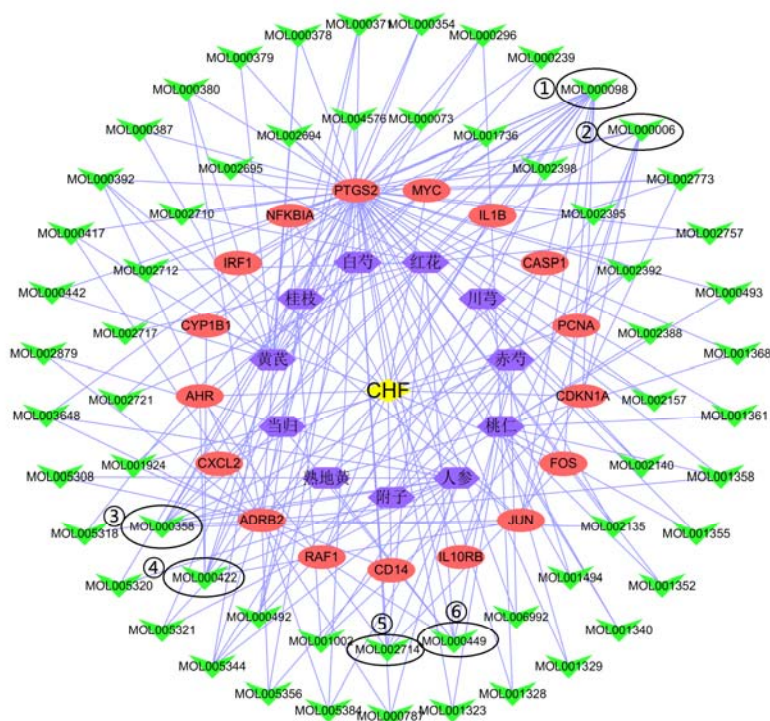


图 2 差异基因火山图

Fig. 2 Volcanic maps of differential genes

1.2.4 PPI 网络的构建 将交集靶点输入 STRING 数据库, 构建 PPI 网络, 再将结果以 TSV 格式导入 Cytoscape 进行分析。Cytoscape 分析得到磷酸化原癌基因 (Jun proto-oncogene, JUN)、白细胞介素 1β (recombinant human interleukin-1 beta, IL1B)、前列腺素内过氧化物合酶 2 (prostaglandin endoperoxide synthase 2, PTGS2)、Fos 原癌基因 (Fos proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit, FOS)、髓细胞增生蛋白 (myelocytomatosis proteins, MYC)、增殖细胞核抗原 (proliferating cell nuclear antigen, PCNA) 等靶点的度值较大, 是核心靶点 (图 4)。



①槲皮素 ②木犀草素 ③β-谷甾醇 ④山柰酚 ⑤黄芩素 ⑥豆甾醇
①quercetin ②luteolin ③beta-sitosterol ④kaempferol ⑤baicalein ⑥stigmasterol

图 3 “中药-成分-交集靶点-疾病”网络图

Fig. 3 Network diagram of “TCM-component-intersection target-disease”

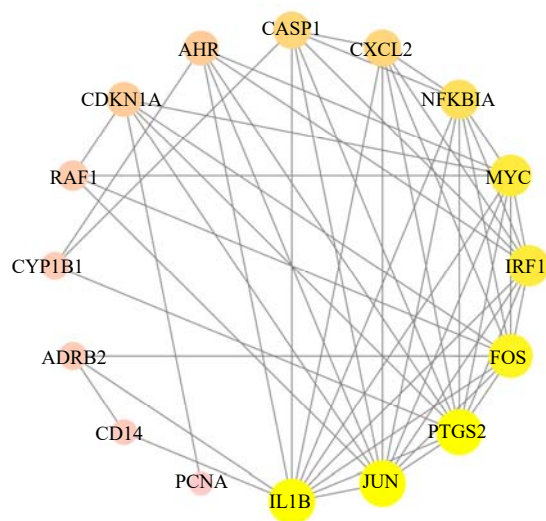


图 4 PPI 网络

Fig. 4 PPI Networks

1.2.5 GO 和 KEGG 富集分析 利用 R 语言的 Cluster Profiler 工具包, 设置 $P < 0.05$ 、 $q < 0.05$ 进行 GO 和 KEGG 富集分析, 根据矫正后 P 值筛选前 20 条进行作图。将前 20 条通路及通路所对应的靶点导入 Cytoscape 进行作图。

GO 通路分析结果显示, BP 富集基因程度包括:

生热、对肌肉拉伸的反应、细胞对机械刺激的反应等; CC 富集基因程度包括: 丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶复合物、蛋白激酶复合物、核染色质等; MF 富集基因程度包括: R-Smad 结合、E-box 结合、RNA 聚合酶 II 激活转录因子结合等 (图 5)。

KEGG 富集分析共富集 89 条通路, 结果显示温阳益气活血方治疗 CHF 的 17 个潜在作用靶点主要参与的关键通路是癌症的通路、C 型凝集素受体信号通路、肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor, TNF) 信号通路、丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen activated protein kinases, MAPK) 信号通路、催产素信号通路、慢性粒细胞性白血病、百日咳、军团菌病、人巨细胞病毒感染等^[1] (图 6、7)。

1.2.6 分子对接验证 在“中药-成分-交集靶点-疾病”网络的构建分析中, 通过 Cytoscape 分析得到排名前 6 的核心化合物是 MOL000098 (槲皮素)、MOL000358 (β-谷甾醇)、MOL000422 (山柰酚)、MOL000006 (木犀草素)、MOL000449 (豆甾醇)、MOL002714 (黄芩素)。分子对接验证通过匹配原则算法模拟蛋白质与小分子受体相互作用。实验结果用结合能来评估分子与靶点的结合能力, 配体与

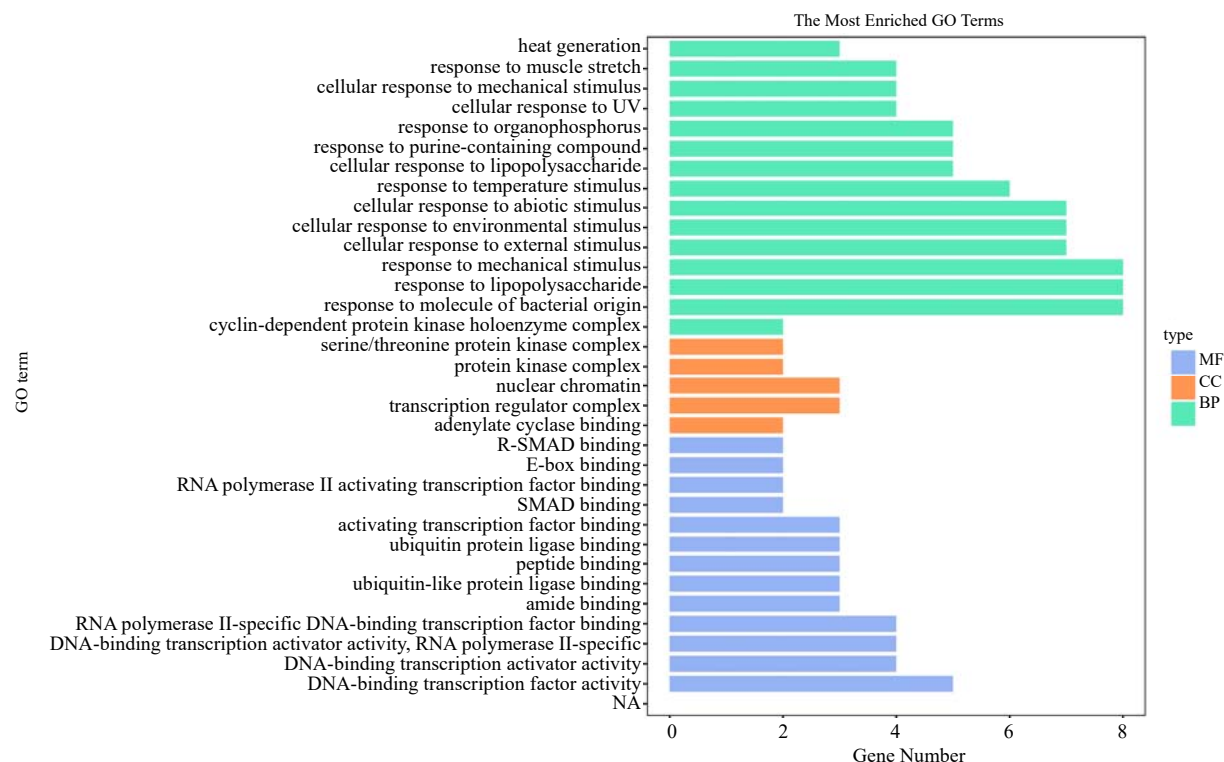


图 5 GO 分析“BP-CC-MF”图

Fig. 5 GO Analysis “BP-CC-MF”

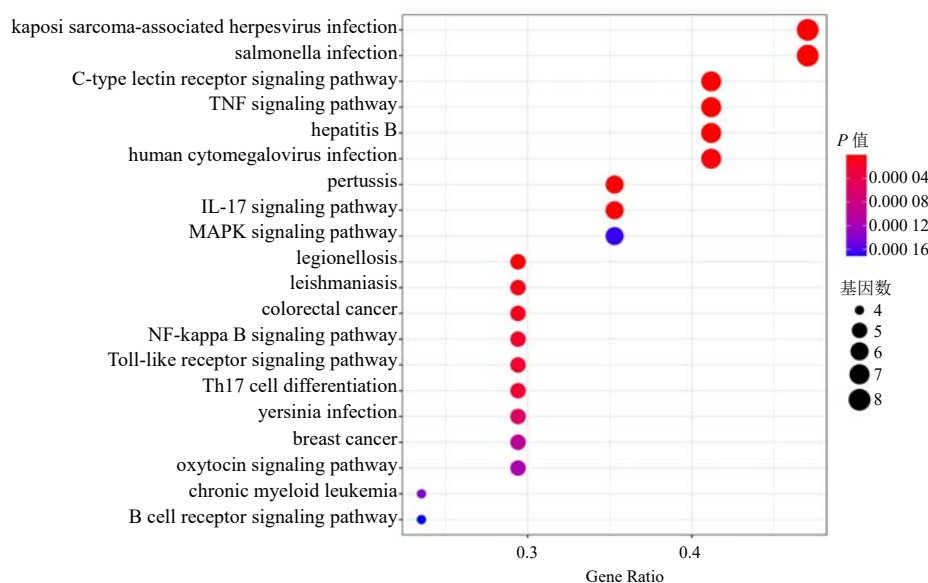


图 6 KEGG 富集分析气泡图

Fig. 6 KEGG Air bubbles before enrichment analysis

受体结合能量越低，结合构象越稳定，相互作用的可能性越大，表明黄芩素与 FOS 的结合亲和力 (binding affinity) 为-38.49 kJ/mol，黄芩素与 PTGS2 为-38.49 kJ/mol，山柰酚与 FOS 为-40.17 kJ/mol，木犀草素与 PTGS2 为-38.91 kJ/mol。本研究结果显示温阳益气活血方的核心化合物与 CHF 共同靶点

结合能均<0，表明化合物与受体能自发结合，结合能≤-5 kJ/mol 表明结合良好，小于-9 kJ/mol 有较强烈的结合活性。分子对接的结合能结果见图 8，其中活性化合物与受体分子有强烈结合的对接模式，见图 9。结果证实温阳益气活血方与 CHF 的交集靶点蛋白有较好的结合活性。

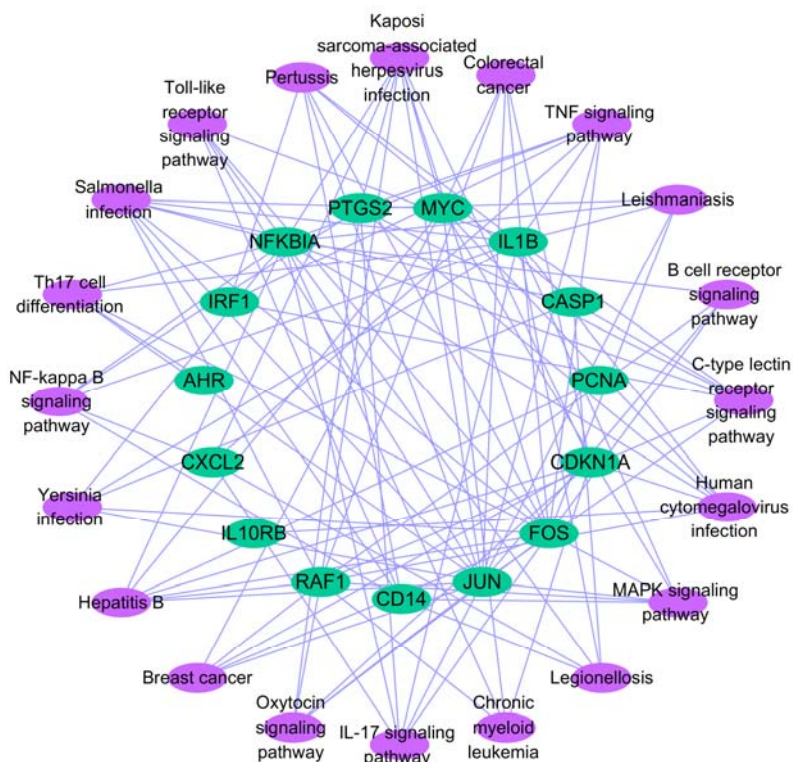


图 7 靶点-通路作用图

Fig. 7 Target-pathway action diagram

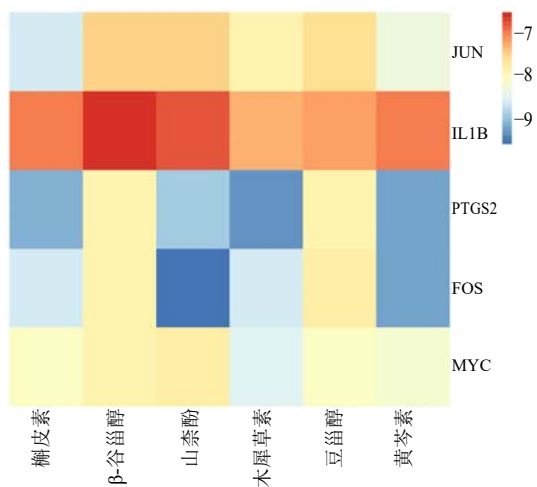


图 8 分子对接能量图

Fig. 8 Energy of molecular docking

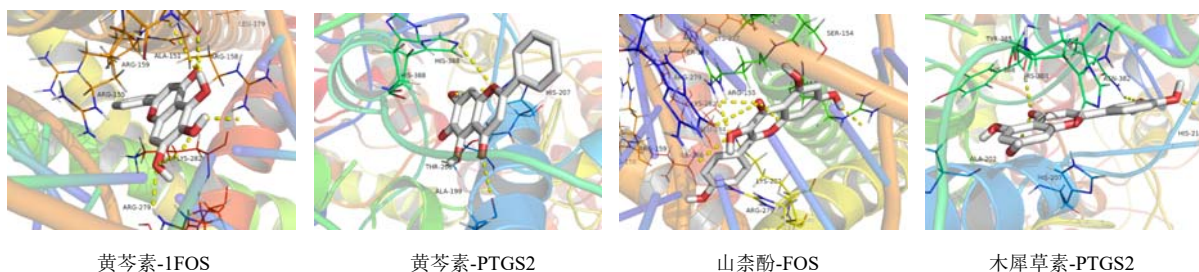


图 9 分子对接模式图

Fig. 9 Molecular docking pattern

2 外周血真核细胞基因表达谱的试验研究

2.1 试剂与材料

2.1.1 试剂 真核生物多 ARNA 控制试剂盒 (批号 900433, 100 rxns, Affymetrix, -20 ℃), 扩增试剂盒 (批号 1792, 100 rxns, Ambion, -20 ℃), 真核生物杂交控制试剂盒 (批号 900454, 30 rxns, Affymetrix, -20 ℃), 杂交、洗涤、染色试剂盒 (批号 900720, 30 rxns, Affymetrix, 4 ℃)。

2.1.2 药物 盐酸贝那普利片 (洛汀新片, 批号 H20054771, 深圳信立泰药业公司), 螺内酯片 (批号 H42020343, 武汉中联四药药业公司), 氢氯噻嗪片 (批号 H20058629, 山西云鹏制药公司), 琥珀酸美托洛尔缓释片 (批号 H20100167, 阿斯利康制药有限公司), 地高辛片 (批号 AHG0335, 杭州赛诺菲安

万特公司), 5%葡萄糖注射液(批号 H1098300, 江西科伦药业有限公司), 温阳益气活血方颗粒剂(批号 20010902, 青海九康中药饮片有限公司)。

2.1.3 仪器 超净工作台(CJT-16, 北京长城有限公司), 微量台式离心机(5415D, Eppendorf 公司), 涡旋混合器(TDX-1, TonDa 公司), 移液器(P-2、P-20、P-200、P-1000, Eppendorf 公司), 离心管架(0.2 mL、0.5~1.5 mL, 江苏三和金冠公司), 冰箱(BCD-223N, 美菱公司), 制冰机(SIM-F124, 三洋公司), PCR 仪(PTC-225, MJ 公司), Magnetic Stand-96(AM10027, Ambion 公司), 紫外分光光度计(ND-1000, NanoDrop 公司), 凝胶成像仪(GDS-7600, UVP 公司), 恒温金属浴(CHB-202, BIOER 公司); Hybridization Oven 640、Fluidics Station 450、GeneChip® Scanner 3000, 均为 Affymetrix 公司。

2.2 方法

2.2.1 资料及临床研究 2018 年 11 月—2020 年 5 月, 从青海省中医院招募的 90 名志愿者, 分为对照组和试验组。对照组为青海省中医院治未病中心选取的 30 名健康人, 安静状态下, 采用抗凝管收集前臂静脉血, 后随机抽取 10 例外周血用于有核细胞基因表达谱的差异检测。试验组为青海省中医院住部心肾科选取的 60 名符合《2018 中国心力衰竭诊断和治疗指南》的患者(相应纳入、排除、脱落标准均参照该指南)^[12]。将试验组 60 例 CHF 患者按随机数字表法分成化学药组和中西药组, 2 组各 30 例患者。临床研究经青海省中医院伦理委员会批准(编号为 qhszyy1102201601), 所有参与者在研究之前均签署知情同意书。

2.2.2 干预方法、标本采集及检测指标 对照组: 为青海省中医院治未病中心选取的 30 名健康人, 均经常规体检后在安静状态下, 采用抗凝管收集前臂静脉血, 后随机抽取 10 例外周血用于有核细胞基因表达谱的差异检测。化学药组: 采用洛丁新片(10 mg/d)、氢氯噻嗪片(50 mg/d)、螺内酯片(40 mg/d)、倍他乐克片(23.75 mg/d)及地高辛片(0.125 mg/d)联合用药, 每日 1 次, 疗程为 15 d; 中西药组: 在常规化学药口服治疗的基础上联合温阳益气活血方颗粒剂, 6 g/次, 2 次/d, 饭后 30 min 温服, 疗程为 15 d。药物干预前后对所有患者进行临床中医症状积分评估、纽约心功能分级、心脏彩超检查左室射血分数(left ventricular ejection fraction, LVEF)^[12-13]。安静状态下, 采用抗凝管收集患者前臂静脉血, 并

将标本分为 2 份, 1 份采用全自动化学发光测定仪检测血清脑钠肽前体(brain natriuretic peptide, BNP), 另 1 份标记后存放在-80℃冰箱, 最后随机抽取化学药组和中西药组中各 5 例治疗前后的外周血用于有核细胞基因表达谱的差异检测。

2.2.3 有效率分析 有效率评价标准参照国家药品监督管理局最新版《中药新药临床研究指导原则》^[14], 将中医症状评分的“改善率”纳为“有效率”, 改善率>67%、改善率介于 25%~67%、改善率<25%, 分别定义为显效、好转及无效。

改善率=(治疗前总分-治疗后总分)/治疗前总分

有效率=(显著+好转)例数/总例数

2.2.4 基因芯片表达检测 CHF 患者在入院后次日清晨安静空腹状态下, 健康对照组在清晨安静空腹状态下, 采用抗凝管收集患者前臂静脉血, 为减少样本的污染, 优先采用其他采血管收集排出前 1 mL 血液。采用 Affymetrix mRNA 表达谱芯片检测样品的总 RNA 为起始, 进行体外扩增和生物素标记, 标记后进行芯片杂交、清洗、染色、扫描, 使用 AGCC 软件分析芯片的荧光图像, 结合生物信息学的转录组学及 RNA 技术分析温阳益气活血方的差异表达基因, 本部分由北京博奥晶典生物技术有限公司完成。标记过程采用 Ambion #1792 cRNA 扩增标记试剂盒。实验流程主要包括以下步骤。(1) 反转录合成 First strand cDNA: 以 Total RNA 起始, 含有 T7 启动子序列的 T7 Oligo(dT) Primer 为引物, 使用 First Strand Enzyme Mix 合成 First strand cDNA。(2) 合成 Second strand DNA: 用 Second Strand Enzyme Mix 将 DNA-RNA 杂合体中的 RNA 链转化为 Second Strand cDNA, 合成双链 DNA。(3) 体外转录合成 cRNA: 以 Second Strand cDNA 为模板, 利用 T7 Enzyme Mix 合成 cRNA, 掺入生物素 biotin。(4) cRNA 纯化: 使用磁珠纯化 cRNA, 除去盐、酶等杂质, 并对 cRNA 进行定量。(5) cRNA 片段化: 将 cRNA 片段化成适宜杂交的大小。(6) 芯片杂交、清洗、染色、扫描。

2.2.5 差异基因的生物信息学分析 表达谱芯片分析温阳益气活血方的差异基因。使用 KOBAS 软件进行 KEGG 通路富集分析, 差异表达基因分析设定 $P<0.05$ 和 $|\log_2FC|>1.2$ 为筛选条件。 $\log_2FC>1.2$ 表明基因表达上调; $\log_2FC<-1.2$ 表明基因表达下调。

2.2.6 RNA 差异表达分析 主要使用 AGCC 软件

进行芯片清洗染色,后分析芯片的荧光图像,进行 RNA 差异表达分析,比较中西药组与化学药组治疗后的差异表达基因。 P 值取对数再取负值 ($-\lg P$), $-\lg P$ 值越大说明 miRNA 显著性水平越高。

差异 LncRNA 与差异 mRNA 的筛选:比较中西药组与化学药组治疗后二者的差异表达。采用 R 语言包进行差异分析,获得差异倍数并取对数 ($\log_2 FC$)。差异 LncRNA 与差异 mRNA 的定义为: $|\log_2 FC| > 1.2$ 且 $P < 0.05$,将 $\log_2 FC > 1.2$ 定义为表达上调, $\log_2 FC < -1.2$ 定义为表达下调。

2.2.7 统计学分析 采用 SPSS19.0 统计软件进行数据分析,描述数据如年龄大小、病程长短等符合正态分布的数据均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,各组治疗前后采用配对 t 检验,组间比较采用成组 t 检验。计数资料如男女比列、心功能分级采用 χ^2 检验。若不符

合正态分布,则采用非参数检验。检验水平 $\alpha = 0.05$, $P < 0.05$ 认为有显著性统计学差异, $P < 0.01$ 认为有极显著性差异。

2.3 基因芯片实验结果

2.3.1 一般临床资料比较 2 组患者男女总数属正态分布,采用 χ^2 检验, $P = 0.432 > 0.05$,差异不具有统计学意义;2 组患者年龄大小,属正态分布,使用独立样本 t 检验, $P = 0.759 > 0.05$,差异不具有统计学意义;2 组患者病程长短属正态分布,采用独立样本 t 检验, $P = 0.883 > 0.05$,差异不具有统计学意义;试验组 2 组患者药物干预前心脏彩超 LVEF 值,使用独立样本 t 检验, $P = 0.932 > 0.05$,差异不具有统计学意义。2 组患者入院心功能分级采用 χ^2 检验, $P = 0.432 > 0.05$,2 组差异无统计学意义。以上指标均具有可比性(表 2)。

表 2 两组患者一般资料比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Comparison of general data between two groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	n/例		年龄/岁	病程/年	治疗前 LVEF/%	心功能/例	
	男	女				II 级	III 级
化学药	14	16	77.00 $\pm$ 8.92	7.83 $\pm$ 3.79	60.73 $\pm$ 9.62	14	16
中西药	11	19	76.30 $\pm$ 8.66	7.97 $\pm$ 3.16	60.93 $\pm$ 8.55	11	19

2.3.2 血清 BNP 水平 试验组 2 组患者药物干预前后血清 BNP 水平均在正态分布范围内,治疗前采用独立样本 t 检验, $P = 0.891 > 0.05$,差异不具有统计学意义;2 组治疗后采用成组 t 检验,治疗前后 t 值不同, $P < 0.01$,表明差异有统计学意义,且 15 d 疗程后,血清 BNP 水平均下降,表明治疗有效。2 组患者经 15 d 治疗后,血清 BNP 水平差异采用独立样本 t 检验, $P = 0.041 < 0.05$,表明治疗后 2 组患者血清 BNP 水平有明显差异,且中西药组治疗效果优于化学药组(表 3)。

2.3.3 中医症状积分 2 组患者入院前中医症状积分比较采用独立样本 t 检验, $P = 0.408 > 0.05$,两组差异无统计学意义;2 组经 15 d 治疗后,治疗前后及组间中医症状积分疗效评价采用秩和检验, $P = 0.037 < 0.05$,表明 2 组患者药物治疗后中医症状积分差异有统计学意义,且中西药组治疗效果优于化学药组(表 4)。

2.3.4 心功能分级 2 组患者经 15 d 治疗后,评价治疗前后心功能分级,疗效标准参考纽约心功能评价^[14]。心功能疗效比较采用秩和检验,中西药组有

效率为 87%,化学药组为 77%, $P = 0.027 < 0.05$,表明 2 组患者药物治疗后心功能疗效差异有统计学意义,且中西药组治疗效果优于化学药组(表 5)。

2.3.5 有效率 临床评价量表以“心悸、气短、疲乏、浮肿”的轻、中、重为主症评分,分别计 1、2、3 分,主要兼症及次要兼症按同样计分标准,汇总 2 组药物干预前后的总分,按“2.2.3”项下方法计算,得出中西药组的显效例数多于化学药组,无效例数略少,化学药组的好转例数较中西药组略多,但中西药组的有效率明显优于化学药组(表 6)。

2.3.6 芯片杂交结果分析 2 组不同药物干预后,外周血基因表达谱中 15 886 个基因表达上调(主要上调表达基因为 *ZNF331*、*TRAPPC10*、*SMAD7*、*MYC*、*RORA*),26 754 个基因表达下调(主要下调表达基因为 *RHOB*、*LRRN3*)。结合网络药理学预测和 $|\log_2 FC|$,关键基因见表 7。主要基因参与的富集信号通路见图 10。初步证实 Th17 细胞分化、B 细胞受体信号通路、AMPK 信号通路是关键通路,与芯片上调基因相关,可揭示温阳益气活血方治疗 CHF 的作用机制。与网络预测的结果相符合。

表 3 血清 BNP 水平 ($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Levels of serum BNP ($\bar{x} \pm s$)

组别	n/例	观察时间	BNP/(pg·mL ⁻¹)
化学药	30	治疗前	1 030.16 ± 286.73
		治疗后	572.01 ± 180.14**
中西药	30	治疗前	1 041.76 ± 359.59
		治疗后	470.92 ± 194.77***

与同组治疗前比较: ** $P < 0.01$; 与化学药组治疗后比较: # $P < 0.05$

** $P < 0.01$ vs same group before treatment; # $P < 0.05$ vs chemical medicine group after treatment

表 4 中医症状积分比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 4 Comparison of TCM symptom scores ($\bar{x} \pm s$)

组别	n/例	观察时间	中医症状积分
化学药	30	治疗前	24.90 ± 2.48
		治疗后	13.57 ± 4.22*
中西药	30	治疗前	25.57 ± 3.61
		治疗后	11.03 ± 4.94*#

与同组治疗前比较: * $P < 0.05$; 与化学药组治疗后比较: # $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs same group before treatment; # $P < 0.05$ vs chemical medicine group after treatment

表 5 心功能疗效比较

Table 5 Comparison of cardiac function and curative effect

组别	n/例	显效	好转	无效	有效率/%
化学药	30	9	14	7	77
中西药	30	18	8	4	87*

与化学药组比较: * $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs chemical medicine group

表 6 两种药物干预后有效率比较

Table 6 Comparison of efficacy of two drugs after intervention

组别	n/例	显效	好转	无效	有效率/%
化学药	30	9	14	7	77
中西药	30	13	11	6	80*

与化学药组比较: * $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs chemical medicine group

2.3.7 RNA 差异表达分析结果 Cluater 采用归一化后的数据, 聚类使用 amap 包的 hcluster (method=LinkMethod), 绘图采用 heatmap.2。化学药组、中西药组对比, 绘制 2 组关键基因的 mRNA、LncRNA 热图 (图 11)。由图 11 表明, 2 组不同药物 (化学药与中西药) 干预后与关键基因 (表 7 中的基因)

表 7 关键基因的芯片验证

Table 7 Microarray validation of key genes

基因	网络预测	芯片验证
ZNF331	GEO 数据库	mRNA
TRAPPC10		
SMAD7		
IER3		
RORA		
RUNX3		
MYC		
ZNF217		
PCNA		
RHOB		LncRNA
LRRN3		

的差异表达密切相关。

构建 ceRNA (LncRNA-miRNA-mRNA) 网络: 通过 mircode 数据库寻求差异 LncRNA 的靶基因 miRNA, 与自制芯片的 miRNA 取交集, 再通过 miRDB、miRTarBase、TargetScan 数据库寻求相应的 mRNA, 与自制芯片的 mRNA 取交集, 最后 Cytoscape 绘制网络图。miRNA 富集度分析, 若 P 值相同, miRNA 富集度越大, 表明该 miRNA 受到实验的影响越大; $P < 0.01$ 表示 miRNA 具有显著性差异。LncRNA 的 $|\log_2FC| \geq 2$ 及 mRNA 的 $|\log_2FC| \geq 2$ 。

采用桑基图 (图 12) 展示以 miRNA 为联系的 LncRNA 上游基因调控和 mRNA 下游基因调控。预测 LncRNA 干预 CHF 的主要基因包括: 真核翻译延伸因子 1 α 1 (EEF1A1P25)、干扰素诱导酶 1 (GVINP1)、嗅觉受体家族 (OR2A9P)。OR2A9P 是 G 蛋白偶联受体成员, 与鼻中气味分子相互作用, 启动神经递质-激素受体反应, 作用于心血管系统。预测的相关 miRNA 与芯片验证的关键基因相关: RHOB 基因相关的 miR-27a-3p 可抑制血管内皮细胞的增殖、迁移, 对血管重构具有保护作用; ZNF331 的启动子区甲基化可诱导 miR-140-5p 对脂多糖介导的血管内皮细胞增殖及分化具有浓度依赖性, 是心血管疾病早期效应标志物; MYC 基因与血清 miR-129-5p 水平密切相关, 血清 miR-129-5p 水平可预判 CHF 患者预后, 与 LVEF 相关。因此, 上述预测的 miRNA 和基因也可用于温阳益气活血方的质量控制及疾病标志物筛选, 为 CHF 的治疗提供参考。

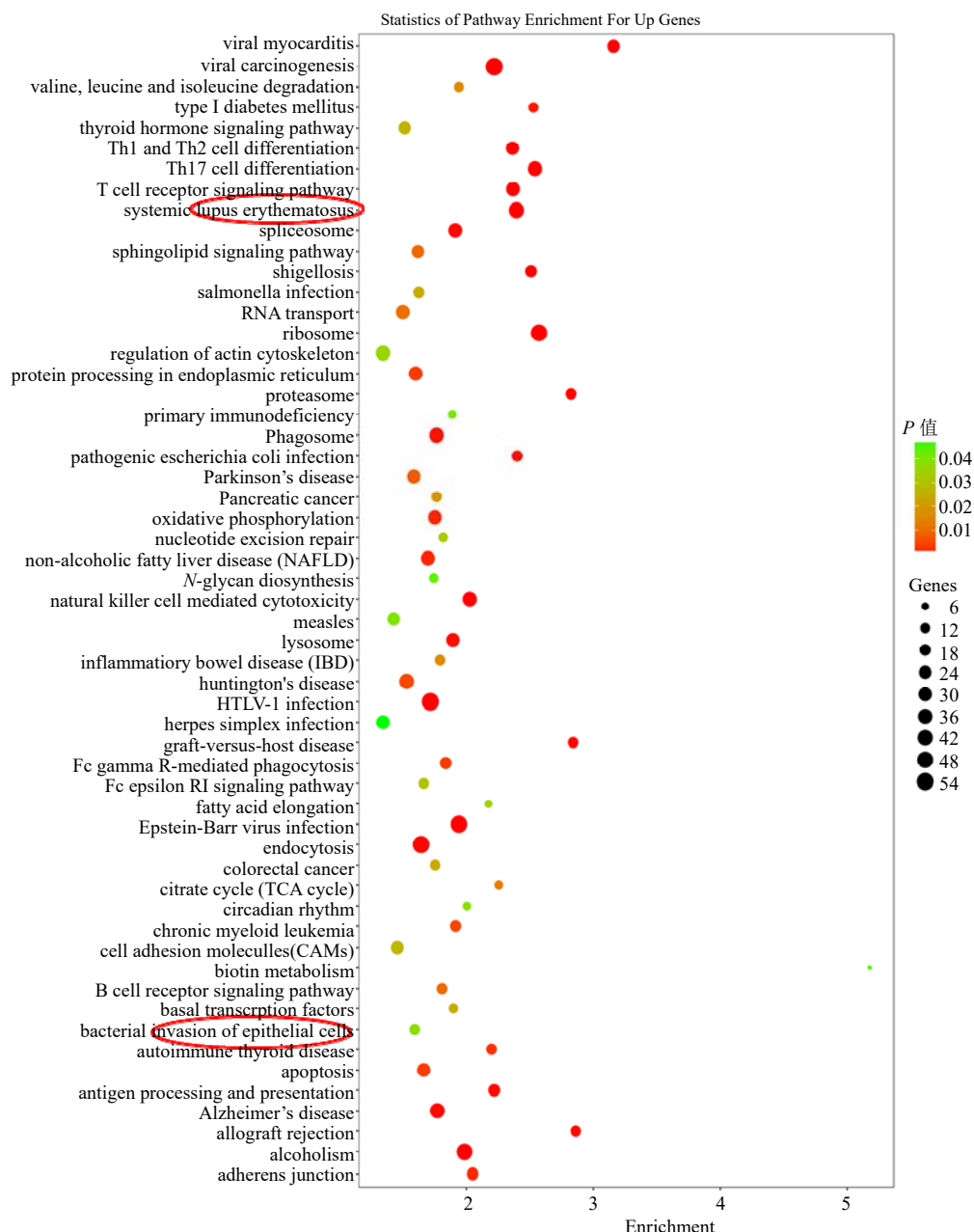


图 10 治疗后化学药组与中西药组芯片上调基因信号通路富集分析

Fig. 10 Enrichment analysis of up-regulated gene signaling pathway in western medicine group and Chinese and western medicine group after treatment

3 讨论

传统温阳益气活血方为历朝经验集方，虽配伍各异，作用却殊途同归。其配伍原则如下：方中以附子、桂枝为君，附子善温肾中命门之火，张景岳（擅长用附子）也称之大能引火归元，可见附子温走三焦，其温性用之中的，便可妙不尽言。桂枝可认为是不典型的“补阳药”，又能入血分起温阳活血通滞之用。人参、黄芪、熟地黄为臣。人参规格繁多，本方最适合配伍红参，参经火制则阳气增，徐灵胎

曾认为民生、医者皆滥用人参，但人参功效不可质疑，人参在培补元气之余又能扶正祛邪；佐配伍黄芪，一者助参治气虚之功，再者黄芪养血利水行滞助桂附益气化瘀；熟地补精填髓，为阳气化气提供能源物质基础。当归、白芍、川芎为佐。川芎乃血中气药，在活血同时兼理气作用，气行则血行；当归补血活血，一防血虚留瘀，二防行血伤血，另外防年高羸弱之人大便难；白芍使肝气柔和调畅，不亢盛，恶血不归于心，且兼酸甘化阴血之性。桃仁、

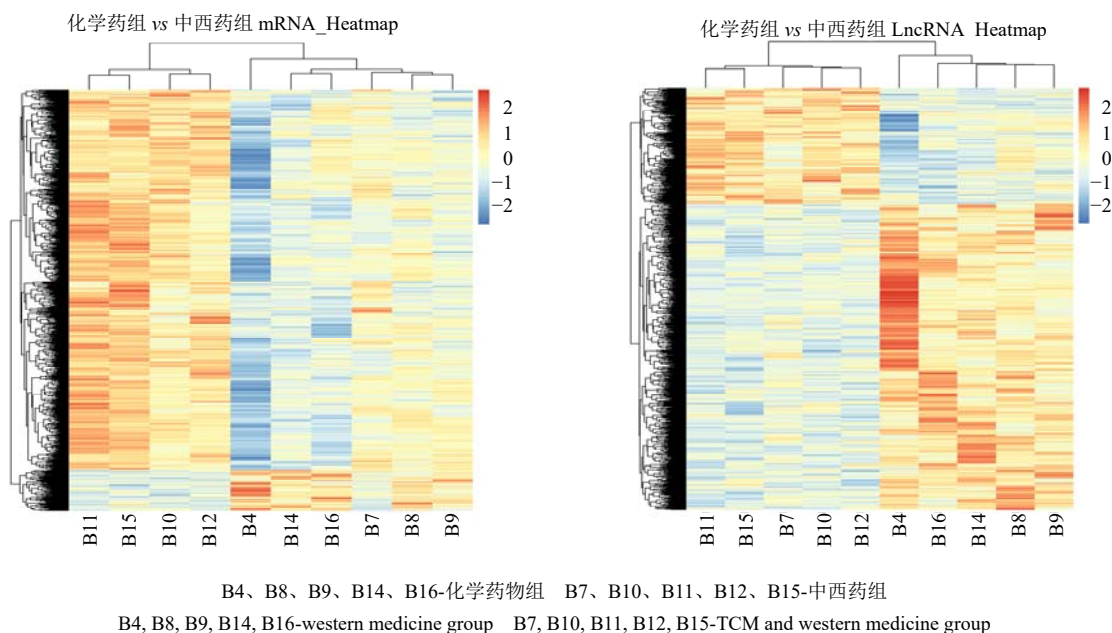


图 11 治疗后化学药组 vs 中西药组热图

Fig. 11 Heat map of western medicine group vs Chinese medicine group after treatment

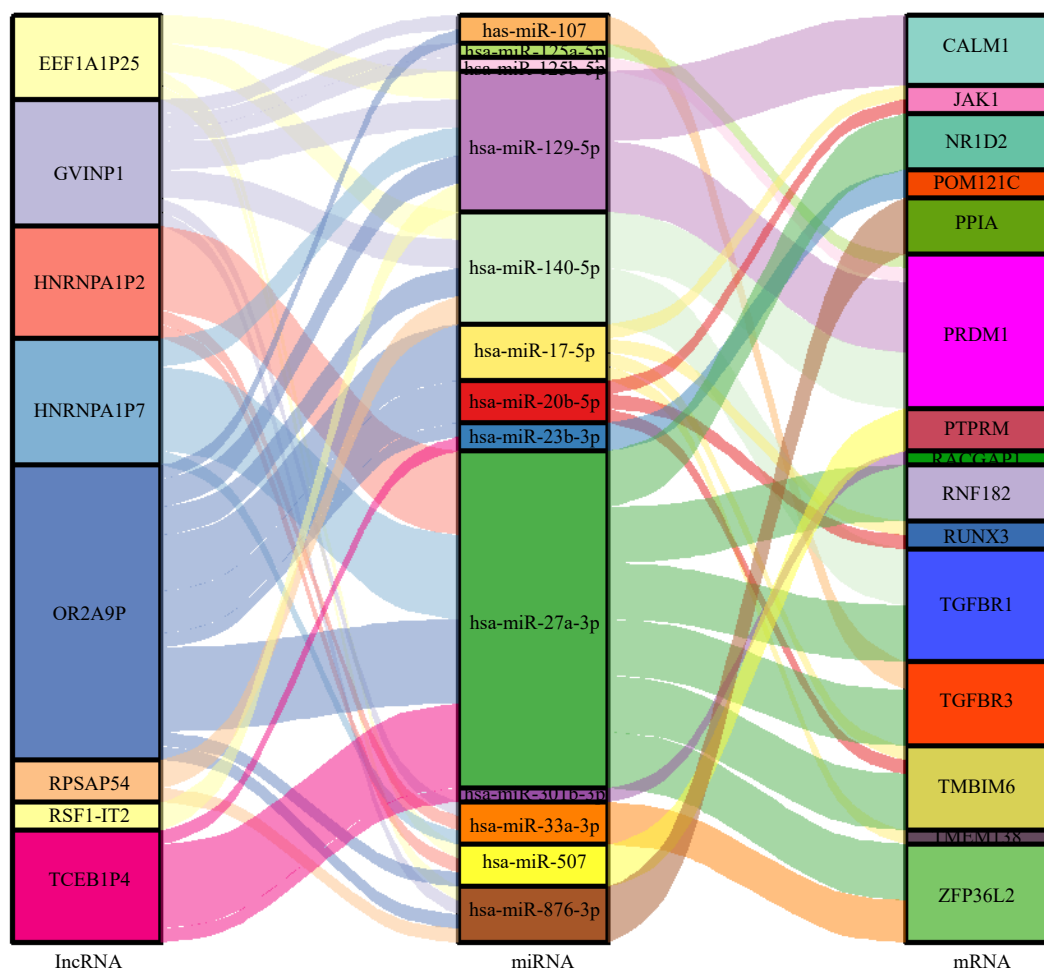


图 12 外周血基因芯片桑基图

Fig. 12 Sankey map of peripheral blood gene microarray

红花、赤芍为使。桃仁性平，行血但不耗血，同时佐当归润肠通便；红花、赤芍一温一凉，互相制约，共奏活血之效。

基因芯片技术分析表明，磷脂酰肌醇 3 激酶-蛋白激酶 B (phosphoinositide-3 kinase-protein kinase B, PI3K-Akt)、AMPK 通路是关键基因所富集的通路，三磷酸腺苷结合能是芯片 GO 差异分析的主要生物过程。腺苷酸活化蛋白激酶是丝氨酸/苏氨酸激酶在进化过程中的一种高度保守状态^[15]，能启动人体线粒体开始产能代谢，有“能量代谢总开关”之称。其同源蛋白能参与真核生物细胞核的转录，也在介导的凋亡过程中被激活，因此被认为是凋亡的调节剂^[16]。GO 富集分析结果表明，温阳益气活血方的作用靶点在多种细胞组分中存在，并且以细胞质分布为主，以扩散-运输的结合方式参与多种经典生物进程。MAPK 信号转导通路是一细胞内的经典通路（细胞内的一类丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶）^[17]，其存在于大多数细胞内，从低等原核细胞至高等哺乳动物，在生物进化过程中有高度保守性，其将细胞外刺激信号转导至细胞及其核内，并在引起细胞生物学反应（如细胞增殖、分化、转化及凋亡等）的过程中具有至关重要的作用。有实验研究证实 CHF 可通过激活 MAPK 和 PI3K/Akt 信号通路^[18-19]，使肺动脉平滑肌细胞大量增殖，最终导致肺动脉高压^[20]。

脂多糖是 CHF 的重要毒力因子，可诱导心肌细胞肥大，使心肌细胞体积增大^[21]，心肌细胞骨架微丝密度增大，排列紊乱，其机制可能与 Toll 样受体 4/核因子 κ B (Toll-like receptor4/nuclear factor- κ B, TLR4/NF- κ B) 信号通路相关的炎症反应有关^[22]。提示温阳益气活血方“能通过多靶点、多通路，在 CHF 中起到关键治疗作用。

Gui 等^[23]研究证实可通过 AMPK 信号通路上调自噬，抑制游离脂肪酸 (free fatty acid, FFA) 的游离脂代谢，降低低氧环境下肺动脉平滑肌细胞诱导增殖的可能。有实验数据显示，在 24 h 缺氧密闭的大鼠肺动脉平滑肌细胞培养液中，添加高浓度 FFA 液，AMPK 在内质网中翻译的活性被抑制，而抗磷脂综合征 (antiphospholipid syndrome, APS) 能促进 FFA 被摄取利用，降低 FFA 在培养液中的浓度，而 APS 能降低 CHF 死亡风险，已被广泛证实，CHF 患者晚期不仅存在高 FFA 上限水平，而且也存在 FFA 融合利用障碍。CHF 的血液循环多瘀，导致心肌细胞内 FFA 蓄积、ATP 减少。

杨冬花等^[24]研究发现，温阳益气活血方能通过抑制 β 3-肾上腺素受体 (β 3-adrenoceptor agonists, β 3-AR) 的表达减少 I 型前胶原羧基端原肽 (type I procollagen carboxyl terminal propeptide, PICP) 和 III 型前胶原氨基端肽 (procollagen III N-termi, PIIINP) 含量，逆转心室重塑，从而改善心脏功能。李春陵等^[25]探讨温阳益气活血方通过抑制 GATA 结合蛋白 4 (GATA binding protein4, GATA4) 的表达减少 I 型胶原含量，降低 I 型/III 型胶原值，逆转心室重塑，改善心脏功能。综上所述，温阳益气活血方对 CHF 心室重塑是通过调控 β 3-AR、血清 I 型、III 型胶原含量来控制 LVEF、左心室收缩末期内径 (left ventricular end systolic dimension, LVESD)、左心室舒张末期内径 (left ventricular end diastolic diameter, LEVDD) 等主要效果指标，并且观察组与对照组治疗前后的实验结果发现，观察组总有效率明显高于对照组 ($P < 0.05$)；治疗后，观察组的 LVEF 指标显著高于对照组，观察组的 LVESD、LVEDD 均低于对照组 ($P < 0.05$)。张聪聪等^[26]探讨温阳益气活血方通过化痰作用将转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β) / Smads 信号通路和肺动脉压力相联系并且起到调控的作用。

脂肪酶移位酶 (fatty acid translocase, FAT) / CD36T 和肉毒碱棕榈酰转移酶 -1 (carnitine palmitoyl transterase-1, CPT-1) 是 2 个参与 FFA 转运的关键酶^[27]，与心肌、骨骼肌产能也密切相关。CD36 是多种组织细胞膜上的糖蛋白，也是心脏 FAT 的主要形式。另外，分布于胞浆中是 FAT/CD36，CPT-1 主要在线粒体膜上分布，其表达增加可促使 FFA 的跨膜运输，进而线粒体氧化 ATP 增加，而 CD36 类似一种跨膜运输反应的媒介催化剂，可加速 FFA 的摄取。但研究发现 CHF 时，上述 2 种关键酶均减少或者活性被抑制而降低，最终致使 FFA 的摄取和利用率障碍^[28]。

可见 APS 在充分能抑制 AMPK 通路活性的情况下，FAT/CD36T 和 CPT-1 的膜转位表达，也受抑制，因此 AMPK 与 2 个关键酶存在共线关系，彼此间的活化或抑制是一种充分必要条件。因此改善 APS 成为 CHF 一种有前景的治疗手段，APS 催化 CD36 跨膜反应使心肌加大对 FFA 的摄取，从而心肌代谢底物的结构被改造，可能是“胚胎化”代谢底物的一种同分异构体，最终底物逆向化状态被打

破, 进而改善 CHF 相关症状。

而研究者通过提取具有益气活血功效的中药化学成分作用 AMPK 信号通路时^[29], 发现心肌细胞对 FFA 的利用率提高, 心肌细胞的 ATP 代谢从最初的糖酵解和乳酸氧化反应逐渐转变为以脂肪酸氧化代谢为主导。这就是“逆向化状态被打破”, 同时其对肺动脉平滑肌细胞的大量增殖有逆转作用, 使肺动脉压力降低, 延缓肺血管重构。细胞增殖的中断对低氧性肺动脉高压有扭转作用, 甚至使病理机制改变, 减轻肺血管阻力^[20]。

又有研究者证实, 红景天联合温阳益气活血方对低氧环境下心衰大鼠模型的肺动脉血管平滑肌细胞的诱导增殖有保护作用, 温阳益气活血方类似于 AMPK 信号通路活化剂^[30]。结果表明, 红景天单方、温阳益气活血方、加味红景天方皆可通过 AMPK 通路逆转肺动脉平滑肌细胞的增殖和胰岛素抵抗, 减少胰岛细胞的损伤凋亡, 加速心肌细胞对葡萄糖的利用^[31]。最终证实红景天单方、温阳益气活血方、加味红景天方对 CHF 有治疗作用。

miRNA 是单链的非编码小 RNA, 通过碱基互补配对原则将 mRNA 的 3'或 5'UTR 区与特定靶基相结合, 可直接降解 mRNA 或抑制相关蛋白质的翻译过程, 因此 miRNA 与疾病的发生、发展是密切相关的^[32-33]。是多种生物过程的重要调控因子, 如细胞重编程、增殖、凋亡、迁移等过程, miRNA 在心肌细胞炎症反应中参与重要调节功能。笔者通过自制 Affymetrix mRNA 芯片进行差异性分析, 关键 miRNA 的筛选, 并将 LncRNA 最具功能性的基因对温阳益气活血方治疗 CHF 的 mRNA 核心基因进行调控。芯片筛选出的 miR-140-5p 表达随脂多糖浓度的增高而降低^[34], 脂多糖介导的 KCNQ1 重叠转录物 1 (KCNQ1 overlapping transcript 1, KCNQ1OT1) 参与血管内皮细胞迁移的调控, KCNQ1OT1 通过竞争内源 RNA 抑制蛋白酪氨酸磷酸酶 IVA 型成员 3 (proteintyrosine phosphatase type IVA, member 3, PTP4A3) 所介导的 MAPK、PI3K/Akt 信号通路^[35], 这与芯片所富集出的通路相一致, miR-140-5p 可作为 CHF 早期干预治疗的效应标志物; miR-27a-3p 抑制血管内皮细胞 HUVECs, 进而抑制主动脉中膜弹力纤维和胶原纤维的生成, 影响血管重构, 对 CHF 具有保护作用^[36]; miR-129-5p 可通过 Wnt5a 信号通路调节血管平滑肌^[37], 而 Wnt5a 信号通路在自制芯片中参与差异改变,

miR-129-5p 可介导 Wnt5a 通路调节血清骨桥蛋白对炎症的反应, 诱导心肌细胞 IL-17 大量聚集^[38], 减少脂蛋白受体摄取脂质, 这也证实了网络药理学富集的 IL-17 通路是重要通路。CHF 的心功能恶化症状与心肌细胞炎症反应密切相关, 进而减少炎症反应发生。

综上所述, 可通过多层次、多通路、多靶点导致 CHF 的发生、发展, 因此对于 CHF 的治疗需要通过中药组合的协同靶向作用, 即多成分-多途径-多靶点的发挥联合治疗作用。大数据的挖掘可节约科研成本, 课题组将对关键基因、通路进行 RT-PCR 及 Western blotting 实验验证。现从网络药理学理论出发将温阳益气活血方的药物作用趋向与 CHF 靶标加以联系分析, 同时经 CHF 患者外周血基因芯片验证, 以期能进一步挖掘对 CHF 治疗的潜在干预靶标与作用机制^[39], 为中医药治疗疑难疾病的临床研究和新药研制开发提供坚实理论依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 2020 心肌梗死后心力衰竭防治专家共识 [J]. 中国循环杂志, 2020, 35(12): 1166-1180.
- [2] 马丽媛, 吴亚哲, 陈伟伟. 《中国心血管病报告 2018》要点介绍 [J]. 中华高血压杂志, 2019, 27(8): 712-716.
- [3] 李忠宽. 温阳益气活血方对慢性心力衰竭外周血有核细胞基因表达谱的影响研究 [D]. 西宁: 青海大学, 2020.
- [4] Liu R Q, Wu L Y, Feng H J, et al. The study on the interactions of two 1, 2, 3-triazoles with several biological macromolecules by multiple spectroscopic methodologies and molecular docking [J]. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*, 2020, 243: 118795.
- [5] 张戣, 吴东升, 徐寅, 等. 基于网络药理学分析半夏-黄芩-黄连治疗幽门螺杆菌相关性胃炎的作用机制 [J]. 天然产物研究与开发, 2020, 32(4): 592-599.
- [6] 吴朗杰, 赵春燕, 战丽彬. 基于网络药理学和分子对接研究白花蛇舌草和半枝莲药对治疗宫颈癌的作用机制 [J]. 中草药, 2021, 52(4): 1049-1058.
- [7] 黄小靖, 刘卓超, 许禄华, 等. 基于网络药理学探究黄连生物碱干预原发性高血压的作用机制 [J]. 中医药导报, 2020, 26(11): 112-117.
- [8] 罗雪菲, 王伟, 赵晓芳, 等. 基于网络药理学探讨桃莲绞复方增强全成分肿瘤细胞疫苗抗结直肠癌作用分子机制 [J]. 中草药, 2021, 52(2): 459-468.
- [9] 王转茸. 超表达 OsPGIP2 提高油菜菌核病抗性及其防卫反应机理的解析 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2018.
- [10] 翟园园, 李鑫, 高梦婷, 等. 基于分子对接技术筛选二至丸治疗骨质疏松的活性成分及验证 [J]. 药学报, 2020, 55(6): 1222-1228.

- [11] 申鑫惠, 杨宇峰, 石岩. 基于网络药理学探讨四君子汤治疗糖尿病作用机制 [J]. 中华中医药学刊, 2020, 38(6): 37-41.
- [12] 中国心力衰竭诊断和治疗指南 2018 [J]. 中华心力衰竭和心脏病杂志, 2018(4): 196-225.
- [13] 陈可冀, 吴宗贵, 朱明军, 等. 慢性心力衰竭中西医结合诊疗专家共识 [J]. 中国中西医结合杂志, 2016, 36(2): 133-141.
- [14] 严士海, 王道成, 沈竹阳, 等. 参葵通脉颗粒治疗慢性心力衰竭气虚血瘀证 310 例临床观察 [J]. 中医杂志, 2018, 59(4): 316-320.
- [15] Srivastava S, Mehta P, Sharma O, *et al.* Computationally guided identification of Akt-3, a serine/threonine kinase inhibitors: Insights from homology modelling, structure-based screening, molecular dynamics and quantum mechanical calculations [J]. *J Biomol Struct Dyn*, 2020, 38(14): 4179-4188.
- [16] Alamry K A, Srivastava S, Shahbaaz M, *et al.* Unravelling the unfolding pathway of human Fas-activated serine/threonine kinase induced by urea [J]. *J Biomol Struct Dyn*, 2021, 39(15): 5516-5525.
- [17] 弓雪峰, 任培中, 崔红生, 等. 基于网络药理学探讨哮喘宁颗粒防治心理应激哮喘的作用网络与潜在机制 [J]. 首都医科大学学报, 2020, 41(4): 576-589.
- [18] 李慧, 孙乐栋. 红景天苷抗衰老和抗氧化药理机制研究新进展 [J]. 中国医药导报, 2018, 15(7): 51-54.
- [19] 张江. 缺氧诱导因子-2 α 通过影响调节性T细胞来保护肝脏缺血再灌注损伤 [D]. 上海: 上海交通大学, 2016.
- [20] Fei fei H, Yaozhe LI, Ting Z, *et al.* Protective effect of salidroside on rats with hypoxic Pulmonary hypertension by suppressing oxidative stress [J]. 中国病理生理杂志, 2018, 34(3): 500-506.
- [21] 杨涛, 许美霞, 刘涛, 等. 灯盏花素调控 miR-499 对脂多糖所致心肌 H9c2 细胞损伤的保护机制 [J]. 中国临床药理学杂志, 2020, 36(10): 1328-1332.
- [22] 李佳佳, 朱云波, 康玲伶, 等. 通心络对脑缺血再灌注大鼠 TLR4 和 NF- κ B 表达的影响 [J]. 中国免疫学杂志, 2020, 36(6): 672-676.
- [23] Gui D, Cui Z M, Zhang L, *et al.* Salidroside attenuates hypoxia-induced pulmonary arterial smooth muscle cell proliferation and apoptosis resistance by upregulating autophagy through the AMPK-mTOR-ULK1 pathway [J]. *BMC Pulm Med*, 2017, 17(1): 191.
- [24] 杨冬花, 顾广富, 罗建华. 益气温阳活血方对慢性心力衰竭心室重塑大鼠 β 3-肾上腺素能受体、血清 I 型前胶原羧基端肽和 III 型前胶原氨基端肽的影响 [J]. 中国老年学杂志, 2016, 36(19): 4678-4680.
- [25] 李春陵, 顾广富, 罗建华, 等. 益气温阳活血方对慢性心力衰竭心室重塑大鼠 GATA4 表达的影响 [J]. 中华中医药杂志, 2014, 29(9): 2967-2970.
- [26] 张聪聪, 张晶晶, 武垣伶, 等. TGF- β /Smads 通路参与 EndoMT 在 HHPH 中的作用及益气温阳活血化痰方的干预效应 [J]. 中国病理生理杂志, 2018, 34(3): 507-514.
- [27] 宋杰, 胡阳黔, 刘坚, 等. 黄芪多糖对慢性心衰大鼠心肌 AMPK 活性和 FFA 代谢的影响 [J]. 中国病理生理杂志, 2015, 31(1): 28-32.
- [28] Umbarawan Y, Syamsunarno M R A A, Koitabashi N, *et al.* Myocardial fatty acid uptake through CD36 is indispensable for sufficient bioenergetic metabolism to prevent progression of pressure overload-induced heart failure [J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 12035.
- [29] 滕伟, 郑先杰, 巩贵宏, 等. 微小 RNA-23a 通过靶向 PTEN 基因抑制 AMPK 信号通路诱导的大鼠 H9c2 细胞肥大 [J]. 中华心血管病杂志, 2020(4): 329-335.
- [30] Nan X M, Su S S, Ma K, *et al.* Bioactive fraction of *Rhodiola algida* against chronic hypoxia-induced pulmonary arterial hypertension and its anti-proliferation mechanism in rats [J]. *J Ethnopharmacol*, 2018, 216: 175-183.
- [31] Zhou C J, Li A, Hou A H, *et al.* Modeling methodology for early warning of chronic heart failure based on real medical big data [J]. *Expert Syst Appl*, 2020, 151: 113361.
- [32] 陈新怡, 宋厚盼, 陈小娟, 等. 黄芩-黄连药对治疗幽门螺杆菌相关性消化性溃疡的核心基因与关键 microRNA 筛选研究 [J]. 天然产物研究与开发, 2020, 32(9): 1456-1469.
- [33] Cao D R, Di M, Liang J J, *et al.* MicroRNA-183 in cancer progression [J]. *J Cancer*, 2020, 11(6): 1315-1324.
- [34] 辛秉昌, 吴洪斌, 孙德刚, 等. miR-140-5p 对脂多糖介导牙髓干细胞增殖及分化的作用 [J]. 山东医药, 2018, 58(21): 45-47.
- [35] 徐丹, 李恒, 卢雁媛, 等. 疏丹暴露诱导血管内皮细胞迁移的表观遗传调控机制研究 [A] // 中国毒理学会表观遗传毒理专业委员会第一次学术大会论文集 [C]. 广州: 中国毒理学会表观遗传毒理专业委员会, 2020: 16-17.
- [36] 孙羽东. miR-27a-3p 调控内皮细胞功能参与主动脉夹层血管重构的机制研究 [D]. 上海: 中国人民解放军海军军医大学, 2017.
- [37] 金枫, 唐菱, 王加璐, 等. miR-27a-3p 在高血压性脑出血患者外周血中呈下调表达 [J]. 中国临床神经科学, 2017, 25(4): 361-367.
- [38] 段冰杰, 党颖徐, 刘坤. 急性冠状动脉综合征患者血清 miR-129-5p 水平及意义 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2020, 28(5): 442-446.
- [39] 先国峰. 益气温阳活血利水方对慢性心衰患者预后影响的回顾性研究 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2019.

[责任编辑 潘明佳]