

基于网络药理学及实验验证探究芪苈强心胶囊治疗射血分数保留型心衰的作用机制

郝佳梦^{1,2}, 常丽萍^{4,5}, 王璐^{3,5}, 刘焕³, 陈檬^{3,5}, 侯斌^{3,4}, 周璐恒³, 侯云龙^{1,2,3*}

1. 河北医科大学, 河北 石家庄 050017

2. 河北以岭医院 国家中医药管理局重点研究室(心脑血管络病), 河北 石家庄 050023

3. 石家庄以岭药业股份有限公司, 河北 石家庄 050023

4. 络病研究与创新中药国家重点实验室, 河北 石家庄 050023

5. 河北省络病重点实验室, 河北 石家庄 050023

摘要: **目的** 基于网络药理学及实验验证探讨芪苈强心胶囊治疗射血分数保留型心衰(heart failure with preserved ejection fraction, HFpEF)的作用机制。**方法** 将 44 个明确鉴定的芪苈强心胶囊体内代谢物检索有效成分, 利用 Swisstargetprediction、pharmmapper 平台预测化合物靶点, OMIM、DisGenet、GenCard 数据库中检索 HFpEF 疾病靶点; 取交集靶点, 利用 String 数据库和 Cytoscape 3.7.2 软件进行蛋白质-蛋白质相互作用(protein-protein interaction, PPI)和拓扑分析; Metascape 平台对共同靶点进行基因本体(gene ontology, GO)功能富集分析及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。构建醋酸脱氧皮质酮(deoxycorticosterone acetate, DOCA)盐敏感型 HFpEF 大鼠模型, 给予沙库巴曲缬沙坦或芪苈强心胶囊进行干预, 给药 8 周后, 利用小动物超声成像系统、ELISA、免疫荧光、Western blotting、qRT-PCR 方法进行药效学评估和环磷酸鸟苷(cyclic guanosine monophosphate, cGMP)-蛋白激酶 G1(protein kinase G1, PKG1)信号通路相关靶点验证。**结果** 芪苈强心胶囊有效成分和 HFpEF 分别筛选出 38 个相同作用靶点; GO 功能及 KEGG 通路富集分析得出其在血液循环、循环系统、心脏收缩等生物过程, 膜筏、轴突、细胞质区等细胞成分, α -葡萄糖苷酶活性、内肽酶活性、水解酶活性等分子功能上起作用, 涉及 cGMP-PKG 信号通路、肾素分泌、钙信号通路等。体内实验证实芪苈强心能够提高 HFpEF 大鼠射血分数, 降低室壁肥厚程度, 缩短等容舒张时间(isovolumic relaxation time, IVRT), 提升左室舒张期充盈速度比值($P<0.05$); 提高血清一氧化氮(nitric oxide, NO)、cGMP 水平($P<0.05$); 增强心肌组织内皮型一氧化氮合成酶(endothelial nitric oxide synthase, eNOS)荧光表达($P<0.05$ 、 0.01); 增加 eNOS、PKG1、心肌肌浆网 Ca^{2+} -ATP 酶(sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase, SERCA)、可溶性鸟苷酸环化酶 α (soluble guanylate cyclase α , sGC α)蛋白表达水平($P<0.05$ 、 0.01), 降低 cGMP 特异性磷酸二酯酶 5A(cGMP-specific phosphodiesterase 5A, PDE5A)蛋白表达水平($P<0.05$); 减少心肌组织 B 型脑钠肽(B-type brain natriuretic peptide, BNP)、 β -肌球蛋白重链(myosin heavy chain β , β -MHC)的 mRNA 表达($P<0.05$)。**结论** 芪苈强心胶囊可通过成分-多靶点-多环节发挥 HFpEF 的治疗作用, 其机制与调节 cGMP-PKG 信号通路有关。

关键词: 网络药理学; 芪苈强心胶囊; 射血分数保留型心衰; 内皮功能; 络病学说; 环磷酸鸟苷-蛋白激酶 G1 通路

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2022)14-4365-11

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.14.016

Mechanism of Qili Qiangxin Capsule in treatment of heart failure with preserved ejection fraction based on network pharmacology and experimental verification

HAO Jia-meng^{1,2}, CHANG Li-ping^{4,5}, WANG Lu^{3,5}, LIU Huan³, CHEN Meng^{3,5}, HOU Bin^{3,4}, ZHOU Lu-heng³, HOU Yun-long^{1,2,3}

1. Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China

2. Key Research Office of State Administration of Traditional Chinese Medicine (Cardiovascular and Cerebrovascular Diseases),

收稿日期: 2022-02-23

基金项目: 国家重点研发计划“中医药现代化研究”重点专项资助项目(2017YFC1700501); 河北省自然科学基金资助项目(H2019106059); 河北省中医药管理局科研计划项目(Z2022020)

作者简介: 郝佳梦(1992—), 女, 博士研究生, 从事心脑血管病中西医结合研究。E-mail: sweet_dreams0502@yeah.net

***通信作者:** 侯云龙, 男, 博士, 教授, 博士生导师, 从事中药药理学研究。E-mail: houyunlonghrb@hotmail.com

Hebei Yiling Hospital, Shijiazhuang 050023, China

3. Shijiazhuang Yiling Pharmaceutical Co., Ltd., Shijiazhuang 050023, China

4. State Key Laboratory of Collateral Disease Research and Innovative Chinese Medicine, Shijiazhuang 050023, China

5. Hebei Key Laboratory of Collateral Diseases, Shijiazhuang 050023, China

Abstract: Objective To explore the mechanism of Qiliqiangxin Capsule (芪蒴强心胶囊, QLQX) in treatment of heart failure with preserved ejection fraction (HFpEF) based on network pharmacology and experimental verification. **Methods** Forty-four clearly identified exogenous substances in QLQX were identified as active ingredients, and targets of compounds were predicted by Swisstarget prediction and Pharmmapper platforms, HFpEF disease targets were retrieved from OMIM, Disgenet and Gencard databases. Intersection targets were collected, String database and Cytoscape 3.7.2 software were used to perform protein-protein interaction network analysis (PPI) and topology analysis. Metascape platform were used to perform gene ontology (GO) and Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) pathway enrichment analysis for common targets. A salt-sensitive HFpEF rat model with deoxycorticosterone acetate (DOCA) was constructed and given sacubitril-valsartan or QLQX for intervention. After eight weeks of administration, small animal ultrasound imaging system, ELISA, immunofluorescence, Western blotting, qRT-PCR methods were used for pharmacodynamic evaluation and cyclic guanosine monophosphate (cGMP)-protein kinase G1 (PKG1) signaling pathway related target validation. **Results** Thirty-eight identical targets were screened out from active ingredients of QLQX and HFpEF; GO function and KEGG pathway enrichment analysis showed that they were involved in biological process (such as blood circulation, circulatory system, cardiac contraction), cellular components (such as membrane rafts, axons, cytoplasmic region) and molecular function (such as α -glucosidase activity, endopeptidase activity, hydrolase activity), involving cGMP-PKG signaling pathway, renin secretion, calcium signaling pathway. *In vivo* experiments confirmed that QLQX increased ejection fraction, reduced degree of ventricular wall hypertrophy, shortened isovolumic relaxation time (IVRT), and increased ratio of left ventricular diastolic filling velocity in HFpEF rats ($P < 0.05$), increased nitric oxide (NO) and cGMP levels in serum ($P < 0.05$), enhanced myocardial endothelial nitric oxide synthase (eNOS) fluorescence expression ($P < 0.05, 0.01$), increased eNOS, PKG1, cardiac sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase (SERCA), soluble guanylate cyclase α (sGC α) protein expressions ($P < 0.05, 0.01$), decreased cGMP-specific phosphodiesterase 5A (PDE5A) protein expression level ($P < 0.05$), decreased B-type brain natriuretic peptide (BNP) and β -myosin heavy chain (β -MHC) mRNA expressions in myocardial tissue ($P < 0.05$). **Conclusion** QLQX can exert the therapeutic effect of HFpEF through component-multi-target-multi-link, and its mechanism is related to the regulation of cGMP-PKG signaling pathway.

Key words: network pharmacology; Qili Qiangxin Capsule; heart failure with preserved ejection fraction; endothelial function; choroid theory; cGMP-PKG1 pathway

射血分数保留型心衰 (heart failure with preserved ejection fraction, HFpEF) 是指左室射血分数 $\geq 50\%$ 的心力衰竭, 特征是左室等容舒张延长、左室僵硬度增加、左室舒张末压增加和左室充盈缓慢^[1]。HFpEF 是一个具有高发病率和高死亡率的紧迫临床事件^[2], 已经成为一个主要的公共健康问题, 其患病率现在已经超过了射血分数降低型心衰 (heart failure with reduced ejection fraction, HFrEF)^[3]。HFpEF 患者的预后较差^[4], 到目前为止, 没有任何治疗显示可以有效降低其发病率或死亡率^[5], 成为国际医学研究的难点和热点。

内皮型一氧化氮合酶 (endothelial nitric oxide synthase, eNOS) / 一氧化氮 (nitric oxide, NO) / 环磷酸鸟苷 (cyclic guanosine monophosphate, cGMP) / 蛋白激酶 G1 (protein kinase G1, PKG1) 通路在防止

心肌损伤、心室重塑和心肾综合征方面起着重要作用^[6], 该通路的损伤是 HFpEF 的病理生理学基础。cGMP 及其主要靶激酶 PKG 是公认的心脏功能和慢性应激反应的调节剂, 介导 NO 和利钠肽的生理功能, 在心血管系统的维持中发挥重要作用: 它们的增强能够引起心肌制动, 减少不适应性肥大, 增强细胞存活信号和线粒体功能, 防止缺血/再灌注损伤, 并减弱儿茶酚胺的刺激作用^[7-8]。激活 cGMP/PKG 信号通路已成为治疗心力衰竭的有效治疗策略^[9], 可能成为 HFpEF 治疗的一个新靶点^[10]。

中医络学说理论指导下研制的芪蒴强心胶囊是治疗慢性心衰的代表中成药, 循证医学研究证实其治疗慢性心力衰竭的安全性及有效性^[11-12]。前期临床研究报道芪蒴强心胶囊对 HFpEF 患者临床症状和中医证候评分、明尼苏达心力衰竭生活质量量

表 (MLHFQ) 评分、6 min 步行试验 (6WMT), E/E' 值、左房容积指数 (LAVI)、左室舒张期充盈速度比值 (E/A) 均有明显改善, 提高患者的生活质量^[13]。芪苈强心胶囊是首个进入《舒张性心力衰竭诊断和治疗专家共识》的中成药^[14], 然而其治疗 HFpEF 的基础研究及机制探讨尚未完全开展。本研究基于网络药理学方法^[15]对芪苈强心治疗 HFpEF 的关键靶点和信号通路预测, 采用醋酸脱氧皮质酮 (deoxycorticosterone acetate, DOCA) -盐敏感性高血压大鼠建立 HFpEF 模型, 通过体内实验验证网络药理学的预测结果, 以探索芪苈强心胶囊治疗 HFpEF 可能的作用机制。

1 材料

1.1 动物

SPF 级雄性 SD 大鼠 50 只, 6 周龄, 体质量 (200±10) g, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司, 合格证号 SCXK2016-0006。饲养于屏障环境中, 12 h 明暗循环光照, 湿度 (50±10) %, 温度 (23±2) °C, 自由进食饮水, 适应性喂养 1 周。动物实验由河北以岭医药研究院动物伦理委员会负责批准 (批准号 2021024)。

1.2 药品与试剂

芪苈强心胶囊 (批号 S-130901) 购自石家庄以岭药业股份有限公司, 利用 UPLC-Q-TOF/MS^E 技术^[16]从芪苈强心胶囊中鉴定了 40 个化合物, 其中黄酮类化合物 3 种, 人参皂苷类化合物 19 种, C₂₁ 甾糖苷类化合物 7 种, 黄芪皂苷类化合物 7 种, 以及丹酚酸类 2 种, 二萜醌类 2 种; 沙库巴曲缬沙坦钠片 (批号 J20190001, 50 mg/片) 购自北京诺华制药有限公司; 醋酸去氧皮质酮 (批号 D129628)、氯化钠 (批号 WXBD3635V) 购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司; NO 测定试剂盒 (A013-2-1) 购自南京建成; cGMP ELISA 试剂盒 (E-EL-0083c) 购自 Elabscience; eNOS、CD31、cGMP 特异性磷酸二酯酶 5A (cGMP-specific phosphodiesterase 5A, PDE5A) 兔抗 (批号分别为 GB12086、GB11063-2、GB111522) 购自武汉赛维生物技术有限公司; 可溶性鸟苷酸环化酶 α (soluble guanylate cyclase α , sGC α) 抗体 (批号 bs-13544R) 购自 Bioss 公司; 肌浆网 Ca²⁺-ATP 酶 (sarco/endoplasmic reticulum calcium ATPase, SERCA2) 抗体 (批号 ab150435)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 抗体 (批号 ab181602)、

羊抗兔二抗 IgG-H&L Alexa Fluor[®] 488 (批号 ab150077)、羊抗兔二抗 IgG-H&L Alexa Fluor[®] 594 (批号 ab150080)、羊抗兔二抗 IgG-H&L IRDye[®] 800CW (批号 ab216773)、羊抗兔二抗 IgG-H&L IRDye[®] 680RD (批号 ab216777) 购自英国 Abcam 公司; 总 RNA 提取试剂盒、反转录试剂盒购自日本 Takara 公司。

1.3 仪器

Vevo 3100LT 型小动物超声 (加拿大 FUJIFILM 公司); RM2235 型组织切片染色机 (日本 Sakura 公司); SynergyH4 型多功能酶标仪 (美国 Bio Tek 公司); Trans-Blot SD 型半干电转膜仪、C1000 型反转录热循环仪 (美国 Bio-Rad 公司); Oddyssey 型双色红外激光扫描膜仪 (美国 LI-COR 公司); LSM710 型激光共聚焦显微镜 (德国 ZEISS 公司); 7900HT 型实时荧光定量 PCR 仪 (美国 ABI 公司)。

2 方法

2.1 网络药理学预测芪苈强心胶囊治疗 HFpEF 的作用机制

2.1.1 芪苈强心胶囊主要活性成分靶点预测 本课题组前期对芪苈强心胶囊 11 味药材通过自建化合物数据库完成对其化学成分的全面检索, 共发现包括黄酮、生物碱、皂苷等在内的多种化合物, 通过大鼠体内代谢物检索, 其中 44 个化合物利用对照品进行了确认^[17]。将这 44 个活性成分, 分别输入 PubChem 平台 (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>) 保存化合物的 mol2 结构, 未查询到的根据文献检索确定其化合物结构, 在 Swisstargetprediction (<http://www.swisstargetprediction.ch>) 和 Pharmmapper (<http://www.lilab-ecust.cn/pharmmapper>) 平台中上传化合物结构图, 搜索的输入格式为 Homo sapiens[organism], 得到相应预测靶点。

2.1.2 HFpEF 疾病相关靶点信息 在 OMIM (<https://omim.org/>)、DisGeNET (<https://www.disgenet.org/>)、GenCard (<https://www.genecards.org/>) 数据库中检索“射血分数保留型心衰”“HFpEF”“射血分数保留型心衰”“舒张性心衰”的疾病相关靶点, 去除重复值。应用 R 软件将得到的疾病靶点和筛选出的药物活性成分及潜在靶点进行比较, 得到二者共同靶点并制作韦恩图, 得到药物和疾病共同靶点。

2.1.3 芪苈强心胶囊-HFpEF 蛋白质-蛋白质相互作用 (protein-protein interaction, PPI) 网络的构建 在 String (<https://string-db.org/>) 数据库导入共同基因数

据,选择“homo sapiens”物种,将 medium confidence (0.7) 设置为最低相互作用分数,其余参数默认,导出 PPI 网络图和 TSV 文件。利用 Cytoscape 3.7.2 软件构建 PPI 拓扑网络。

2.1.4 基因本体 (gene ontology, GO) 功能富集分析及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 运用 Metascape (<https://metascape.org>) 平台对 38 个活性成分和疾病的共同靶点进行 GO 功能和 KEGG 通路富集分析,分析类型为 H.sapiens (38),设置 $P < 0.01$,取排名前 10 和前 20 的结果分别绘制 GO 柱状图和 KEGG 气泡通路图,运用 R 软件进行结果可视化。

2.2 实验验证

2.2.1 造模、分组及给药 HFpEF 采用 DOCA-盐敏感大鼠模型:大鼠麻醉后右侧卧位固定,消毒后沿脊柱左侧十二肋游离缘做 2 cm 纵形切口,手术缝合线结扎整个肾动静脉及输尿管,剪去肾脏,ip 10 000 U 青霉素以抗感染。生命体征稳定后放回鼠笼中饲养,1%盐水饮水,同时 sc DOCA (25 mg/kg, 每 4 天 1 次),自由饮食。4 周后使用小动物超声仪检测大鼠心功能,射血分数 (ejection fractions, EF) 大于 50%且 E/A 值降低视为 HFpEF 模型建立成功。

芪茛强心胶囊剂量选择参考国家 973 计划“基于微血管病变性疾病的营卫‘由络以通、交会生化’研究”实验用推荐剂量,其中 0.5 g/kg 剂量为临床等效剂量,本研究选择该剂量为低剂量组,4 倍临床剂量 2 g/kg 为高剂量组,以观察量效关系。沙库巴曲缬沙坦剂量参考药品说明书,换算为大鼠每日给药剂量 20 mg/kg 进行后续实验。

设 10 只未行手术大鼠为对照组,选择 40 只成模大鼠分为模型组、沙库巴曲缬沙坦 (20 mg/kg) 组和芪茛强心胶囊低、高 (0.5、1.0 g/kg) 剂量组,每组 10 只,各给药组 ig 相应药物,对照组和模型组 ig 等体积羧甲基纤维素钠,1 次/d,连续 8 周。

2.2.2 超声心动图检测 各组大鼠心功能 大鼠在 1%异氟醚氧气混合物中麻醉,在胸骨旁长轴切面获得标准 M 型成像,获得获得心率 (heart rate, HR)、EF、左心室前/后壁厚度 (left ventricular anterior/posterior wall thickness, LVAW/LVPW)、左室舒张末期内径/收缩末期内径 (end-diastolic left ventricular internal dimension/end-systolic left ventricular internal dimension, LVIDd/LVIDs)。四腔

心切面的二尖瓣多普勒血流图像中获得等容舒张时间 (isovolumic relaxation time, IVRT)、等容收缩时间 (isovolumic contraction time, LVCT)、被动左室充盈峰值速度 (E) 和心房收缩期峰值流速 (A)。M 型和多普勒研究的扫描速度为 100 mm/s,心率保持在 250~350 次/min。

2.2.3 血清 NO、cGMP 水平的检测 在 12 周实验结束时,从腹主动脉采集血样,轻轻翻转 10 次以上置于冰上。1800×g 离心 10 min,获得上层血清,转移至 1.5 mL 离心管中;再以 13 000×g 离心 2 min,取血清,按试剂盒操作说明检测 NO、cGMP 含量。

2.2.4 免疫荧光染色观测心肌组织 eNOS、CD31 蛋白表达情况 动物处死后,将心脏固定在 10%福尔马林溶液,乙醇脱水后进行石蜡包埋。组织切片 (4 μm) 平行于根尖-基底轴进行。脱蜡和复水后,免疫荧光法测量 eNOS 和 CD31 评估心肌细胞内皮功能及密度。盲法评估随机选择的 5 个视野,并选择 1 个代表性图像。

2.2.5 Western blotting 检测心肌组织 eNOS、PKG1、PDE5A、SERCA、sGCα 蛋白表达 各组大鼠心脏组织加入裂解液,提取蛋白并进行 BCA 定量。蛋白样品经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳,转至 PVDF 膜,用 5%牛血清白蛋白封闭 1 h,加入一抗,4 °C 孵育过夜,洗涤后孵育二抗结合。用 Bio-Rad 校准密度计扫描薄膜,将免疫印迹条带的灰度值强度与内参对照。

2.2.6 qRT-PCR 检测心肌组织 B 型脑钠肽 (B-type brain natriuretic peptide, BNP) 和 β-肌球蛋白重链 (β-myosin heavy chain, β-MHC) mRNA 表达 参照 RNA 提取试剂盒说明书获得大鼠心脏组织中总 RNA 并合成 cDNA,扩增后完成 qRT-PCR 分析。引物序列: β-MHC 上游引物 5'-ACCTGGGCAAGTCCAACAAC-3',下游引物 5'-CGGACACGGTCTGAAAGGAT; BNP 上游引物 5'-AGCCAGTCTCTCCAGAACAATCCA-3',下游引物 5'-CCGGTCTATCTTCTGCCCAAA-3'; GAPDH 上游引物 5'-CTGGAGAAACCTGCCAAGTATG-3',下游引物 5'-GGTGGAAGAATGGGAGTTGCT-3'。

2.3 统计学方法

采用 SPSS 22.0 进行统计处理,所有数据均表示为 $\bar{x} \pm s$ 。符合方差齐性的组间采用单因素方差分析 (One Way ANOVA),最小显著性差异 (LSD) 检

验用于组间比较, 方差不齐的采用 Dunnett 事后 T_3 检验。

3 结果

3.1 网络药理学分析

3.1.1 芪苈强心胶囊治疗 HFpEF 的网络分析结果及靶点预测 44 个活性成分 (表 1) 在 Swisstargetprediction 和 Phrammapper 平台上共得到 (去除重复值) 530 个潜在作用靶点; 在 OMIM、DisGenet、GenCard 数据库中检索“射血分数保留型心衰”“HFpEF”“舒张性心衰”, 3 者取并集, 去除重复值共得到 672 个作用靶点。利用 Venn 图在线平台得到药物和疾病共同作用靶点 38 个, 见图 1。

将 38 个共同靶点输入 STRING 11.0 在线平台得到的药物-疾病靶点 PPI 网络, 共得到 51 条边, 平均节点度 2.68。通过 Cytoscape 3.7.2 内置 Network Analyzer 插件进行 PPI 网络拓扑分析。其中, 发现网络中较为重要的靶基因与 G 蛋白偶联受体、内皮素受体、 β 肾上腺能受体相关。

表 1 芪苈强心胶囊中明确鉴定的活性成分

Table 1 Active components identified in Qili Qiangxin Capsule

活性成分	CAS 号	活性成分	CAS 号
丹参酮 II _A	568-72-9	红柳毒苷	13137-64-9
talatizamine	20501-56-8	川陈皮素	478-01-3
宋果灵	509-24-0	尼奥宁	466-26-2
丹参素钠	67920-52-9	柚皮苷	10236-47-2
sinapine thiocyanate	7431-77-8	新乌头碱	2752-64-9
丹酚酸 B	115939-25-8	丹酚酸 A	96574-01-5
isorhamnetin-3-O- β -D-glucopyranoside	5041-82-7	异鼠李素-3,7-二-O- β -D-葡萄糖苷	6758-51-6
芦丁	153-18-4	hesperidin	520-26-3
迷迭香酸	20283-92-5	次乌头碱	6900-87-4
quercetin-3-O- β -D-glucopyranosyl-7-O- β -gentiobioside	1309067-39-7	kaempferol-3-O- β -D-glucopyranosyl-7-O- β -gentiobioside	16290-07-6
quercetin-3-O- β -D-glucopyranoside	491-50-9	毛蕊异黄酮-7-O- β -D-葡萄糖苷	20633-67-4
人参皂苷 Re	51542-56-4	毛蕊异黄酮	20575-57-9
人参皂苷 Rd	52705-93-8	苯甲酰乌头原碱	63238-67-5
人参皂苷 Rc	11021-14-0	黄芪甲苷 IV	84687-43-4
人参皂苷 Rb ₂	11021-13-9	黄芪甲苷 II	84676-89-1
人参皂苷 Rb ₁	41753-43-9	黄芪甲苷 I	84680-75-1
附子灵	80665-72-1	泽泻醇 F	155521-45-2
刺芒柄花素	485-72-3	泽泻醇 B	18649-93-9
隐丹参酮	35825-57-1	泽泻醇 B 23-乙酸酯	26575-95-1
肉桂酸	621-82-9	泽泻醇 A	19885-10-0
chlorogenic acid	1049703-62-9	20(S)-人参皂苷 Rg ₂	67400-17-3
人参皂苷 Rg ₁	22427-39-0	20(S)-人参皂苷 F ₂	62025-49-4

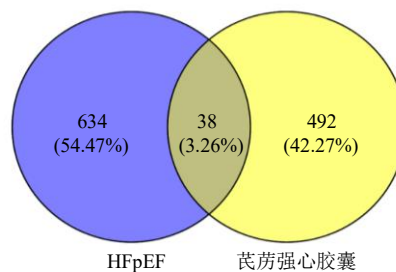


图 1 芪苈强心胶囊与 HFpEF 靶点 Venn 图

Fig. 1 Venn diagram of targets of Qili Qiangxin Capsule and HFpEF

3.1.2 GO 功能及 KEGG 通路富集分析 借助 Metescape 分析平台, 共得到芪苈强心胶囊作用于 HFpEF 治疗的 499 个生物过程, 30 个细胞成分, 31 个分子功能。筛选 $P < 0.01$ 排名前 10 的 GO 注释结果做柱形图展示如图 2。根据分析结果, 芪苈强心胶囊可能参与调控了血液循环、循环系统、心脏收缩等生物过程; 在膜筏、轴突、细胞质区等细胞组分中起作用; 激活了 α -葡萄糖苷酶活性、内肽酶活性、水解酶活性等分子功能。

KEGG 共富集到 52 条通路, 按照 $P < 0.01$, 富集值 ≥ 1.5 筛选前 20 条通路结果如图 2 所示, 芪苈强心胶囊治疗 HFpEF 的潜在途径可能为 cGMP-PKG 信号通路、心肌细胞中的肾上腺素能信号传导、神经活性配体受体相互作用、cAMP 信号通路、肾素分泌、钙信号通路等。其中富集度最高的 cGMP-PKG 信号通路是 HFpEF 治疗的重要靶点^[18], 本研究选用该通路进行体内实验验证探讨芪苈强心胶囊治疗 HFpEF 的作用机制。

3.1.3 网络可视化分析 应用 Cytoscape 3.7.2 软件对 QLQX 有效成分, 疾病-药物共有的 38 个潜在靶基因、生物过程、KEGG 通路进行可视化网络构建, 如图 3 所示。该网络说明芪苈强心胶囊通过多组分、多靶点、多环节发挥对 HFpEF 的治疗作用。

3.2 实验验证

3.2.1 各组大鼠一般状态变化情况 对照组大鼠一般状态良好, 毛色光泽、行动敏捷、饮食及饮水量正常, 尿量正常; 模型组精神状态欠佳, 毛色粗糙, 无光泽, 行动迟缓, 饮水量增多, 尿量增多; 各给药组大鼠精神状态及一般状况有所改善。如表 2 所示, 经药物干预 8 周后, 与对照组相比, 模型组心脏质量和心脏指数均明显提升 ($P < 0.01$); 与模型组相比, 各给药组心脏质量和心脏指数均显著降低 ($P < 0.01$); 各组大鼠体重无明显差异。

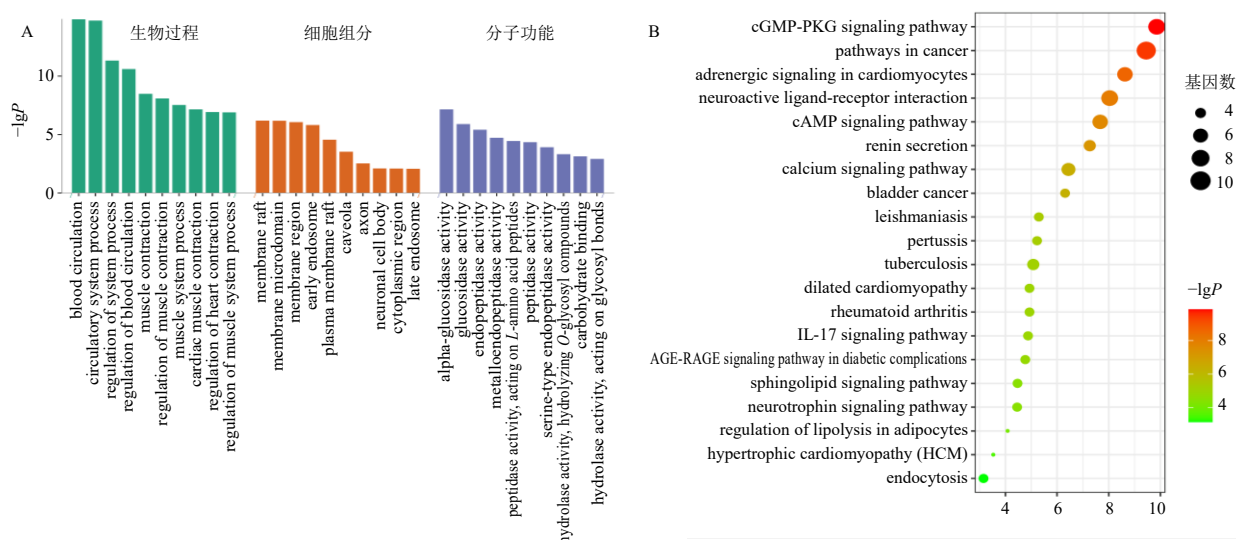
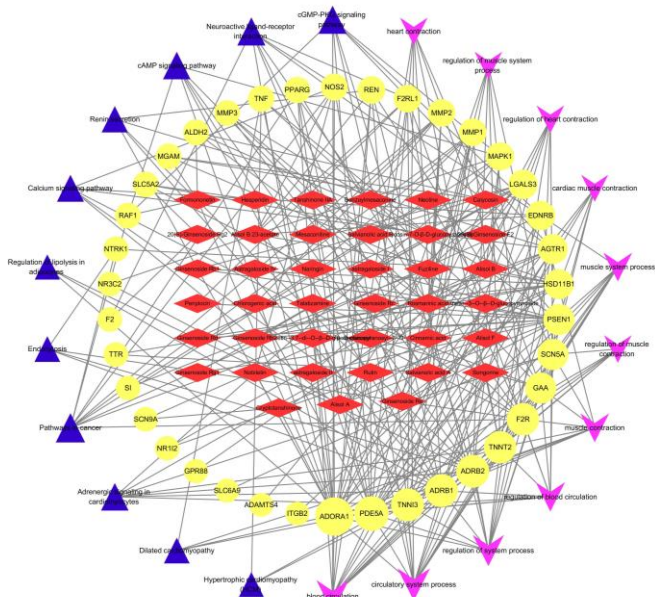


图 2 芪苈强心胶囊对 HFpEF 潜在作用靶点的 GO 功能 (A) 及 KEGG 通路 (B) 富集分析

Fig. 2 GO function (A) and KEGG pathway (B) enrichment analysis of potential targets of Qili Qiangxin Capsule on HFpEF



菱形成节点为活性成分，圆形节点为作用靶点，四边形节点为生物过程，三角形节点为信号通路

diamond nodes are active components, circular nodes are action targets, quadrilateral nodes are biological processes, and triangular nodes are signal pathways

图 3 芪苈强心胶囊治疗 HFpEF 的成分-靶点-生物过程-通路网络

Fig. 3 Ingredients-target-biological process-pathway network of Qili Qiangxin Capsule in treatment of HFpEF

表 2 各组大鼠体质量和心脏指数比较 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)Table 2 Comparison of body weight and cardiac index of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	体质量/g	心脏质量/g	心脏指数
对照	—	508.00 ± 14.90	1.44 ± 0.12	2.78 ± 0.26
模型	—	509.86 ± 53.49	1.86 ± 0.37 ^{##}	3.64 ± 0.49 ^{##}
沙库巴曲缬沙坦	0.02	494.69 ± 42.43	1.54 ± 0.20 [*]	3.11 ± 0.32 ^{**}
芪苈强心胶囊	0.5	496.42 ± 62.45	1.53 ± 0.30 ^{**}	3.07 ± 0.39 ^{**}
	2.0	496.73 ± 66.45	1.52 ± 0.28 ^{**}	3.05 ± 0.27 ^{**}

与对照组比较: [#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$; 与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$, 下表同

[#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$ vs control group; ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ vs model group, same as below tables

3.2.2 芪茛强心胶囊对 DOCA 盐敏感型 HFpEF 大鼠心功能影响 如图 4 和表 3 所示,与对照组比较,模型组大鼠 EF 显著降低 ($P<0.05$), LVAW、LVPW 显著升高 ($P<0.05$), 提示心室壁肥厚, 心功能下降; IVRT 时间延长、E/A 值下降 ($P<0.05$), 提示舒张功能障碍, EF 尚处于正常范围, IVCT 无明显差异, 表明收缩功能未明显损伤。沙库巴曲缬沙坦组 EF 较对照组明显降低 ($P<0.05$), 也处于正常范围; LVAW 较模型组降低 ($P<0.05$), E/A 比值显著提升 ($P<0.01$); 各组 LVIDs、LVIDd 无统计学差异, 提示心室未增大。芪茛强心胶囊低剂量组 EF、

E/A 值较模型组升高 ($P<0.05$), 未能降低室壁厚度。芪茛强心胶囊高剂量组较模型组明显提高 EF, IVRT 时间缩短, E/A 值提升 ($P<0.05$), 提示心室舒张功能明显恢复, 同时 LVAW、LVPW 降低 ($P<0.05$), 减轻了室壁肥厚程度。

3.2.3 芪茛强心胶囊对 DOCA 盐敏感型 HFpEF 大鼠血清 NO、cGMP 水平的影响 如图 5 所示, 与对照组相比, 模型组大鼠血清 NO 和 cGMP 水平均显著下降 ($P<0.05$ 、 0.01); 与模型组相比, 沙库巴曲缬沙坦组血清 NO 水平显著升高 ($P<0.05$), 芪茛强心胶囊低、高剂量组血清 NO 和 cGMP 水平均

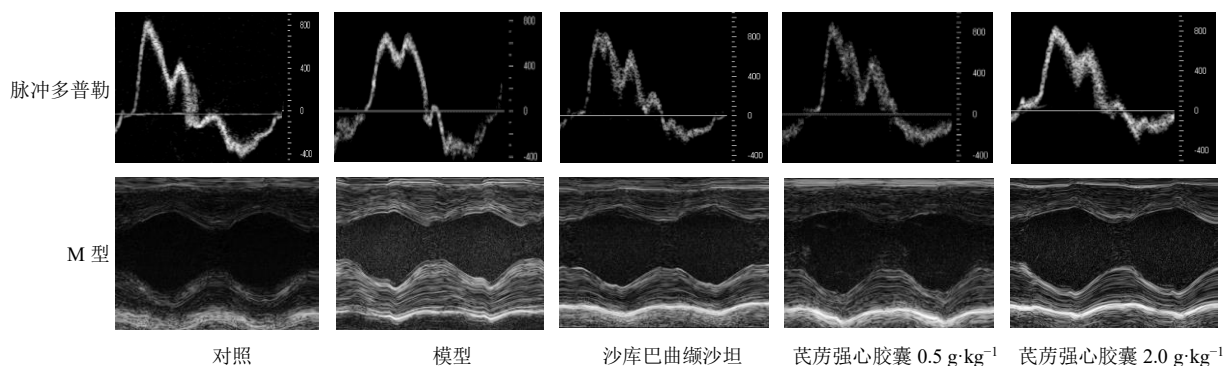


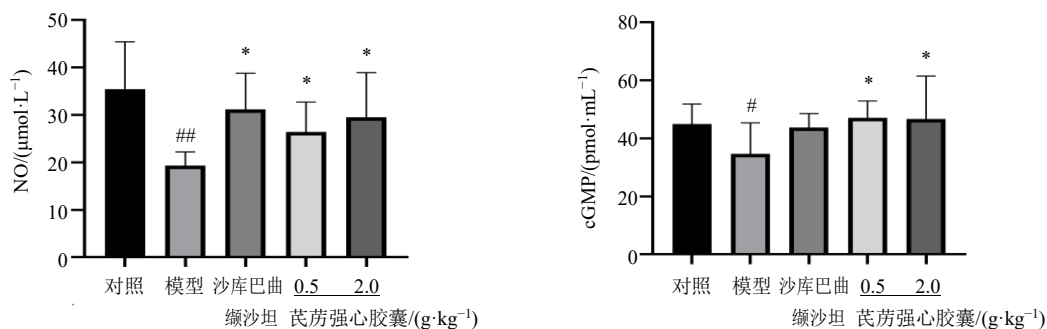
图 4 各组大鼠超声心动图典型图像对比

Fig. 4 Comparison of typical echocardiographic images of rats in each group

表 3 各组大鼠超声心动图参数比较 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Table 3 Comparison of echocardiographic parameters of rats in each group ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	剂量/ (g·kg ⁻¹)	HR	EF/%	LVAW/mm	LVPW/mm	IVRT/ms	IVCT/ms	E/A	LVIDs/mm	LVIDd/mm
对照	—	366.57±25.05	78.68±9.73	3.19±0.60	3.39±0.73	18.17±3.69	18.39±6.31	1.15±0.22	4.74±0.61	8.49±0.64
模型	—	359.31±15.97	67.28±6.04 [#]	3.66±0.44 [#]	3.81±0.50 [#]	20.86±2.98 [#]	18.49±3.84	1.02±0.26 [#]	4.68±0.53	8.21±0.67
沙库巴曲缬沙坦	0.02	350.11±33.31	68.86±2.98	3.32±0.31 [*]	3.63±0.32	19.44±2.87	19.69±3.08	1.18±0.15 ^{**}	4.66±0.57	8.32±0.49
芪茛强心胶囊	0.5	355.69±15.78	72.34±5.36 [*]	3.52±0.37	3.63±0.33	18.97±2.97	19.55±4.03	1.15±0.18 [*]	4.70±0.77	8.55±0.79
	2.0	360.55±30.62	73.85±6.91 [*]	3.39±0.28 [*]	3.60±0.39 [*]	18.23±2.14 [*]	19.05±4.35	1.10±0.17 [*]	4.85±0.66	8.56±0.53



与对照组比较: [#] $P<0.05$ ^{##} $P<0.01$; 与模型组比较: ^{*} $P<0.05$ ^{**} $P<0.01$, 下同

[#] $P<0.05$ ^{##} $P<0.01$ vs control group; ^{*} $P<0.05$ ^{**} $P<0.01$ vs model group, same as below figures

图 5 各组大鼠血清 NO 和 cGMP 水平 ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

Fig. 5 NO and cGMP levels in serum of rats in each group ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

显著升高 ($P < 0.05$)。

3.2.4 大鼠心肌组织 eNOS 和 CD31 免疫荧光染色
内皮功能障碍被认为是 HFpEF 病理生理学的中心机制^[19]。如图 6 所示, 绿色荧光为 eNOS, 红色为 CD31, 二者均为内皮细胞标志物, 共表达处呈现黄

色。如图 7 所示, 与对照组相比, 模型组大鼠心肌组织血管周围 eNOS 荧光表达量显著降低 ($P < 0.01$), 而各给药组均能明显恢复大鼠心肌组织内皮功能 ($P < 0.05$), 芪苈强心胶囊高剂量组效果更为明显 ($P < 0.01$)。

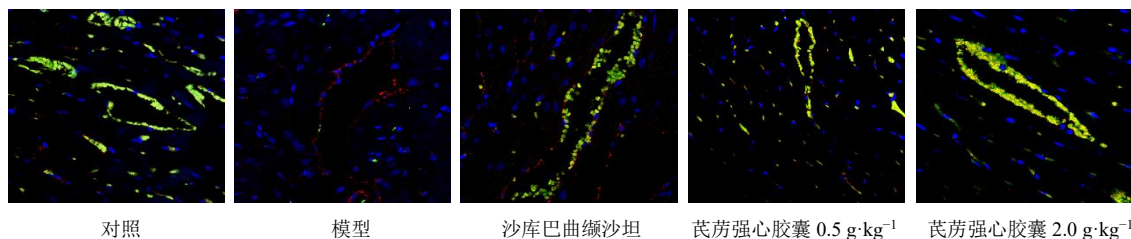


图 6 各组大鼠心肌组织 eNOS (绿色)、CD31 (红色)、DAPI (蓝色) 定位的免疫荧光图像 (×400)

Fig. 6 Immunofluorescence images of eNOS (green), CD31 (red) and DAPI (blue) localization in myocardium of rats in each group (×400)

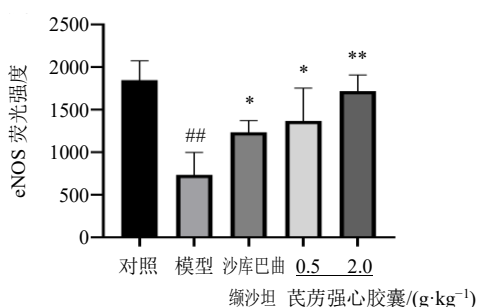


图 7 各组大鼠心肌组织 eNOS 荧光强度比较

Fig. 7 Comparison of eNOS fluorescence intensity of rats in each group

3.2.5 芪苈强心胶囊对心肌组织 eNOS、PKG1、PDE5A、SERCA 和 sGCα 蛋白表达的影响
如图 8 和表 4 所示, 与对照组相比, 模型组大鼠心肌组织 eNOS、PKG1 和 SERCA 蛋白表达水平均显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01), PDE5A 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.05$), sGCα 蛋白表达水平降低但无统计学差异; 与模型组相比, 沙库巴曲缬沙坦组 eNOS、SERCA、sGCα 蛋白表达水平均显著升高 ($P < 0.05$), PDE5A 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05$); 芪苈强心胶囊低剂量组 eNOS、PKG1、sGCα 蛋白表达水平均显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.01), PDE5A 蛋

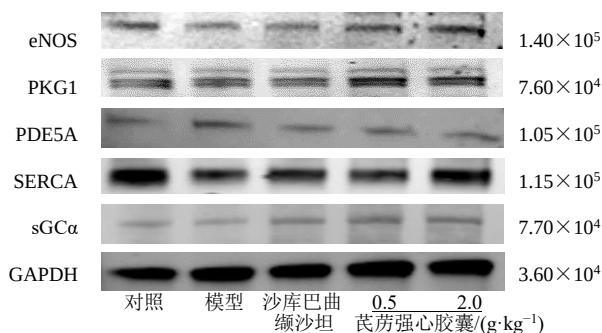


图 8 各组大鼠心肌组织 eNOS、PKG1、PDE5A、SERCA 和 sGCα 蛋白的 WB 图

Fig. 8 WB of eNOS, PKG1, PDE5A, SERCA and sGCα proteins in myocardium of rats in each group

表 4 各组大鼠心肌组织 eNOS、PKG1、PDE5A、SERCA 和 sGCα 的蛋白表达 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Table 4 eNOS, PKG1, PDE5A, SERCA and sGCα proteins in myocardium of rats in each group ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	蛋白相对表达量				
		eNOS	PKG1	PDE5A	SERCA	sGCα
对照	—	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00
模型	—	0.88 ± 0.08 [#]	0.77 ± 0.27 [#]	1.60 ± 0.41 [#]	0.61 ± 0.05 ^{##}	0.88 ± 0.07
沙库巴曲缬沙坦	0.02	1.32 ± 0.17 [*]	0.99 ± 0.23	1.25 ± 0.29 [*]	0.94 ± 0.25 [*]	1.31 ± 0.59 [*]
芪苈强心胶囊	0.5	1.35 ± 0.09 [*]	1.56 ± 0.30 ^{**}	1.24 ± 0.40 [*]	0.76 ± 0.11	1.53 ± 0.63 [*]
	2.0	1.39 ± 0.30 ^{**}	1.44 ± 0.19 [*]	1.30 ± 0.17 [*]	1.02 ± 0.21 ^{**}	1.53 ± 0.46 [*]

白表达水平显著降低 ($P < 0.05$); 芪茛强心胶囊高剂量组 eNOS、PKG1、SERCA 和 sGC α 蛋白表达水平均显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.01), PDE5A 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05$)。

3.2.6 芪茛强心胶囊对心肌组织 BNP 和 β -MHC

mRNA 表达的影响 如图 9 所示, 与对照组相比, 模型组心肌组织 BNP 和 β -MHC mRNA 表达水平均显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.01); 与模型组相比, 各给药组心肌组织 BNP 和 β -MHC mRNA 表达水平均显著降低 ($P < 0.05$)。

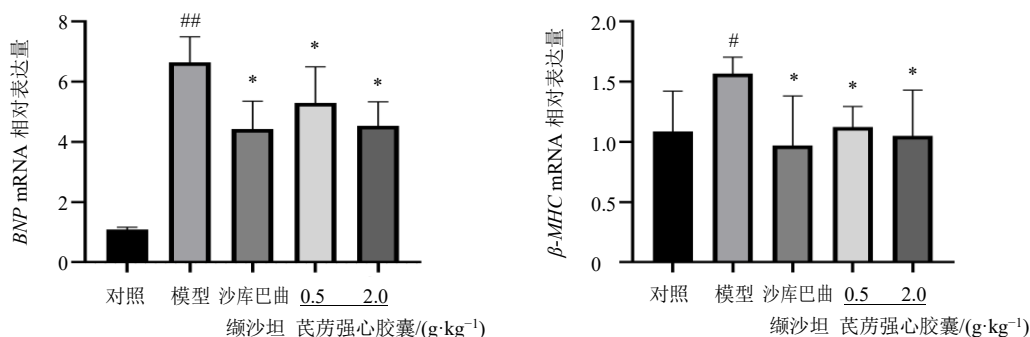


图 9 各组大鼠心肌组织 BNP 和 β -MHC mRNA 表达 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

Fig. 9 BNP and β -MHC mRNA expressions in myocardium of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

4 讨论

HFpEF 与左室舒张功能障碍密切相关, 舒张功能障碍可由肥厚和间质纤维化导致的左室僵硬度增加以及钙循环受损导致的左室舒张异常引起^[20]。内皮炎症及其继发的内皮功能障碍被认为是 HFpEF 其重要病理机制^[21]。肥胖、糖尿病、高脂血症等全身促炎状态可导致冠状动脉微血管内皮炎症, 其级联反应始于内皮细胞, 通过抑制 eNOS 使内源性 NO 生物利用度降低, 继而影响 cGMP 含量及其下游 PKG 活性。这种低活性造成肌浆网上受磷蛋白和 SERCA-2a 活性降低, 使 Ca^{2+} 在肌浆网中积累, 心肌无法正常松弛, 继发心肌细胞僵硬, 舒张功能障碍。

中医将心衰归于“心积”“心水”等范畴, 脉络学说提出, 心积、心水病机多为宗气亏虚, 心气虚乏, 营卫交汇生化障碍为本, 营卫气化失常瘀血阻滞脉络津聚为水为主要病理过程^[22]。宗气亏虚, 心脏气阳虚乏、脉道无力, 血无以运而形成脉络瘀阻, 同时营卫交汇生化失司, 阳虚不能化水, 致使水饮停滞, 气、血、水三分合而发病, 痰瘀互结, 阻滞脉络, 导致络息成积的病理变化, 可引起心脏组织肿大变形, 室壁肥厚、纤维增生, 致使心脏扩大和重塑, 心功能恶化。脉络学说将 HFpEF 病机归纳为“气阳虚乏、络瘀水停、络息心积”, 在“络以通为用”治疗原则指导下, 进一步提出了“益气温阳、活血通络、利水消肿”治法并研制了芪茛强心胶囊。本药以黄芪、附子、人参、陈皮益气温阳, 丹参、

红花活血通络, 葶苈子、香加皮、泽泻、玉竹利水消肿, 桂枝佐使以辛温通络, 温阳化气, 诸药配伍使心慌气短、不能平卧、尿少水肿诸症自消, 抑制心室重构, 改善心脏功能, 对 HFpEF 有较好的疗效^[23]。

本研究采用网络药理学方法, 通过公共数据库对芪茛强心胶囊明确鉴定的成分及 HFpEF 的共同作用靶点, 利用生物信息学技术进行网络构建, 寻找芪茛强心治疗 HFpEF 的可能作用靶点。既往亦有研究^[24-26]通过网络药理学方法探究芪茛强心胶囊的作用机制, 而所探讨的疾病多为慢性心衰(HFrEF)、糖尿病性心肌病、充血性心力衰竭等, 尚无 HFpEF 的网络药理学研究; 同时, 这些研究多通过 TCMSP、BAT-MAN TCM 等平台直接检索芪茛强心胶囊中 11 味药物所有成分的各自靶点, 未通过药物代谢研究探索其在体内真正发挥药效的物质成分, 缺乏针对性, 本研究弥补了这一缺陷。本课题组前期对芪茛强心胶囊 11 味药材通过自建化合物数据库完成对其化学成分的全面检视, 共发现包括黄酮类 22 种、二萜生物碱 33 种、三萜皂苷类 44 种, 苯丙素类 21 种, 其他类化合物 11 种, 其中 44 个化合物利用对照品进行了确认^[17], 又确认了毛蕊异黄酮-7-O- β -D-葡萄糖苷、人参皂苷 Re、人参皂苷 Rg₁、杠柳苷 G 等成分为芪茛强心胶囊强心、利尿及扩血管的重要活性成分^[27]。芪茛强心胶囊组方中黄芪、附子、人参、陈皮益气温阳, 助阳化气, 针对气阳虚乏的基本病机, 本研究中鉴定的主要有效成分包括黄芪甲苷、异鼠李素、新乌宁碱、次乌头碱、人参皂苷、

橙皮苷等, 具有非正性肌力洋地黄类作用, 能改善心肌收缩、扩血管、增加细胞搏动频率和幅度、改善心功能^[28]; 丹参、红花活血化瘀以通脉络, 主要有效成分包括丹酚酸、丹参素钠、丹参酮、毛蕊异黄酮、槲皮素等, 可扩张冠状动脉、减少红细胞聚集、改善血黏度和血液流变等^[29]; 泽泻、葶苈子、香加皮、玉竹养阴利水消肿以缓其症, 主要有效成分包括泽泻醇、异鼠李素、杠柳毒苷、槲皮素-吡喃葡萄糖等, 具有强心、利尿、抗炎、免疫调节等多种生物功能^[30]。这些药理作用为芪苈强心胶囊治疗 HFpEF 奠定了基础。

KEGG 通路富集结果显示, cGMP-PKG 信号通路为芪苈强心胶囊治疗 HFpEF 的高敏感通路, 对此本研究进行了深入探讨。NO-sGC-cGMP-PKG 轴被描述为心脏舒缩的重要调节器^[31]。在生理条件下, 内皮细胞在一级联反应中的关键作用是通过 eNOS 的活性生成 NO, 并激活 sGC 作为其靶细胞(如心肌细胞和血管平滑肌细胞)中的气体递质。作为回应, sGC 产生 cGMP, 这是下游效应器 PKG 酶的关键调节因子, 能够调节血管紧张、松弛和收缩^[32]。该系统的 4 个基本调节因子是磷酸二酯酶(GMP-binding cGMP-specific phosphodiesterase, PDE), PDE5A 对 cGMP 分子具有特异性能够将 cGMP 降解为 5'-GMP, 如果 PDE 上调加上增强的硝基氧化应激, 可能显著导致 HFpEF 患者心肌中 cGMP-PKG 信号受损^[33]。舒张功能障碍还可能由于该通路中 SERCA-2a 活性降低有关, 导致肌浆网清除 Ca^{2+} 功能降低, 舒张期 Ca^{2+} 增加, 心肌松弛异常^[34]。总的来说, cGMP 增加和 PKG 激活导致细胞内游离钙减少, 导致血管平滑肌细胞松弛, 这是该通路主要生理效应之一。

常丽萍^[35]研究发现芪苈强心胶囊可以提高心梗后心衰大鼠主动脉组织中降钙素基因相关肽(calcitonin gene related peptide, CGRP)、cGMP、eNOS 蛋白表达, 同时增强主动脉组织 sGC、PKG mRNA 表达水平, 提示芪苈强心胶囊可以通过舒张血管而增强心肌供血, 其扩展血管机制可能与 eNOS-sGC-cGMP-PKG 通路相关, 证实了芪苈强心胶囊可以通过调控 cGMP-PKG 通路改善心脏/血管舒张功能。本研究亦证实, 芪苈强心胶囊能降低 HFpEF 大鼠心脏指数, 提高 EF, 降低室壁肥厚程度, 缩短 IVRT 时间, 提高 E/A 值, 提示心室舒张功能明显恢复; 同时增加 HFpEF 血清中 NO 水平,

提高 eNOS 表达量, 增强内皮功能; 可降低 PDE5A 对 cGMP 的水解作用增加心脏 cGMP 水平, 同时增强 PKG 活性, 这些过程改善了肌丝功能, 降低了心肌细胞的被动僵硬度, 从而改善了舒张功能。此外, 芪苈强心胶囊还能降低该通路下游心肌肥厚相关因子 BNP 和 β -MHC mRNA 相对表达量增加, 提示其能够增强大鼠排钠利尿和血管平滑肌松弛, 改善心室重构的重要作用。

综上所述, 本研究基于网络药理学构建“药物-有效成分-靶点-疾病”网络, 阐明了芪苈强心胶囊多组分-多靶点-多环节治疗 HFpEF 的作用机制。通过体内实验, 发现芪苈强心胶囊可以多维度、全面的激活 cGMP-PKG 信号通路, 增强内皮功能, 改善心肌被动僵硬程度, 增强 Ca^{2+} 转运功能, 减轻心室重构, 验证了网络药理学的预测结果。这些数据对于阐明芪苈强心胶囊介导的舒张性心功能障碍改善的潜在机制有重要意义, 并为 HFpEF 治疗提供了有力佐证。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Ponikowski P, Voors A A, Anker S D, *et al.* 2016 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure: The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure of the European Society of Cardiology (ESC). Developed with the special contribution of the Heart Failure Association (HFA) of the ESC [J]. *Eur J Heart Fail*, 2016, 18(8): 891-975.
- [2] Groenewegen A, Rutten F H, Mosterd A, *et al.* Epidemiology of heart failure [J]. *Eur J Heart Fail*, 2020, 22(8): 1342-1356.
- [3] Lam C S, Donal E, Kraigher-Krainer E, *et al.* Epidemiology and clinical course of heart failure with preserved ejection fraction [J]. *Eur J Heart Fail*, 2011, 13(1): 18-28.
- [4] Brouwers F P, de Boer R A, van der Harst P, *et al.* Incidence and epidemiology of new onset heart failure with preserved vs. reduced ejection fraction in a community-based cohort: 11-year follow-up of PREVENT [J]. *Eur Heart J*, 2013, 34(19): 1424-1431.
- [5] McMurray J J V, Adamopoulos S, Anker S D, *et al.* ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2012: The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure 2012 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart Failure Association (HFA) of the ESC [J]. *Eur Heart J*, 2012, 33(14): 1787-1847.

- [6] Gheorghiade M, Marti C N, Sabbah H N, *et al.* Soluble guanylate cyclase: A potential therapeutic target for heart failure [J]. *Heart Fail Rev*, 2013, 18(2): 123-134.
- [7] Rainer P P, Kass D A. Old dog, new tricks: Novel cardiac targets and stress regulation by protein kinase G [J]. *Cardiovasc Res*, 2016, 111(2): 154-162.
- [8] Takimoto E. Cyclic GMP-dependent signaling in cardiac myocytes [J]. *Circ J*, 2012, 76(8): 1819-1825.
- [9] Armstrong P W, Pieske B, Anstrom K J, *et al.* Vericiguat in patients with heart failure and reduced ejection fraction [J]. *N Engl J Med*, 2020, 382(20): 1883-1893.
- [10] Breitenstein S, Roessig L, Sandner P, *et al.* Novel sGC stimulators and sGC activators for the treatment of heart failure [J]. *Handb Exp Pharmacol*, 2017, 243: 225-247.
- [11] 吴以岭, 谷春华, 徐贵成, 等. 芪苈强心胶囊治疗慢性心力衰竭随机双盲、多中心临床研究 [J]. 疑难病杂志, 2007, 6(5): 263-266.
- [12] 朱青梅, 潘慧敏, 赵海霞, 等. 芪苈强心胶囊联合沙库巴曲缬沙坦治疗慢性心力衰竭的系统评价 [J]. 药物评价研究, 2022, 45(1): 144-155.
- [13] 田野, 李彦霞, 任君霞, 等. 芪苈强心胶囊治疗舒张性心衰的疗效观察 [J]. 中国临床药理学杂志, 2011, 27(9): 666-668.
- [14] 廖玉华, 杨杰孚, 张健, 等. 舒张性心力衰竭诊断和治疗专家共识 [J]. 临床心血管病杂志, 2020, 36(1): 1-10.
- [15] 牛明, 张斯琴, 张博, 等. 《网络药理学评价方法指南》解读 [J]. 中草药, 2021, 52(14): 4119-4129.
- [16] 康利平, 赵阳, 余河水, 等. 采用 UPLC-Q-TOF/MS^E 鉴别芪苈强心胶囊有效部位中的化学成分 [J]. 药学报, 2011, 46(10): 1231-1236.
- [17] Yun W J, Yao Z H, Fan C L, *et al.* Systematic screening and characterization of Qi-Li-Qiang-Xin Capsule-related xenobiotics in rats by ultra-performance liquid chromatography coupled with quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry [J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2018, 1090: 56-64.
- [18] Breitenstein S, Roessig L, Sandner P, *et al.* Novel sGC stimulators and sGC activators for the treatment of heart failure [J]. *Handb Exp Pharmacol*, 2017, 243: 225-247.
- [19] Shah S J, Lam C S P, Svedlund S, *et al.* Prevalence and correlates of coronary microvascular dysfunction in heart failure with preserved ejection fraction: PROMIS-HFpEF [J]. *Eur Heart J*, 2018, 39(37): 3439-3450.
- [20] Lourenço A P, Leite-Moreira A F, Balligand J L, *et al.* An integrative translational approach to study heart failure with preserved ejection fraction: A position paper from the Working Group on Myocardial Function of the European Society of Cardiology [J]. *Eur J Heart Fail*, 2018, 20(2): 216-227.
- [21] Chadderdon S M, Belcik J T, Bader L, *et al.* Proinflammatory endothelial activation detected by molecular imaging in obese nonhuman primates coincides with onset of insulin resistance and progressively increases with duration of insulin resistance [J]. *Circulation*, 2014, 129(4): 471-478.
- [22] 吴以岭. 脉络论 [M]. 北京: 中国科学技术出版社, 2010: 189-190.
- [23] 王朝远, 胡秀文. 芪苈强心胶囊联合左西孟旦治疗扩张型心肌病心力衰竭的临床研究 [J]. 现代药物与临床, 2020, 35(11): 2238-2242.
- [24] 赵达, 赵振宇, 叶嘉豪, 等. 基于网络药理学和分子对接技术探讨芪苈强心胶囊治疗慢性心力衰竭的作用机制 [J]. 湖南中医药大学学报, 2022, 42(6): 950-957.
- [25] 朱慧明, 乔莉, 冯小龙, 等. 基于网络药理学探讨芪苈强心胶囊治疗充血性心力衰竭的作用机制 [J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2021, 23(11): 3986-3996.
- [26] 李立凤, 杨志华, 王居平, 等. 芪苈强心胶囊治疗慢性充血性心力衰竭作用机制的网络药理学研究 [J]. 长治医学院学报, 2021, 35(2): 89-94.
- [27] 刘奕训, 余河水, 康利平, 等. 芪苈强心胶囊活性部位中的组成成分研究 [J]. 中草药, 2010, 41(7): 1060-1065.
- [28] Cho J Y, Jeong M H, Ahn Y K, *et al.* Comparison of outcomes of patients with painless versus painful ST-segment elevation myocardial infarction undergoing percutaneous coronary intervention [J]. *Am J Cardiol*, 2012, 109(3): 337-343.
- [29] 代晓光, 苏长兰. 丹参化学成分及药理研究进展 [J]. 中医药信息, 2018, 35(4): 126-129.
- [30] 张慧娟, 龚苏晓, 许浚, 等. 泽泻药材的研究进展及其质量标志物的预测分析 [J]. 中草药, 2019, 50(19): 4741-4751.
- [31] Zhao C Y, Greenstein J L, Winslow R L. Roles of phosphodiesterases in the regulation of the cardiac cyclic nucleotide cross-talk signaling network [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2016, 91: 215-227.
- [32] Maurice D H, Wilson L S, Rampersad S N, *et al.* Cyclic nucleotide phosphodiesterases (PDEs): Coincidence detectors acting to spatially and temporally integrate cyclic nucleotide and non-cyclic nucleotide signals [J]. *Biochem Soc Trans*, 2014, 42(2): 250-256.
- [33] Das A, Durrant D, Salloum F N, *et al.* PDE5 inhibitors as therapeutics for heart disease, diabetes and cancer [J]. *Pharmacol Ther*, 2015, 147: 12-21.
- [34] Lovelock J D, Monasky M M, Jeong E M, *et al.* Ranolazine improves cardiac diastolic dysfunction through modulation of myofilament calcium sensitivity [J]. *Circ Res*, 2012, 110(6): 841-850.
- [35] 常丽萍. 芪苈强心胶囊治疗慢性心力衰竭的作用机理及代谢组学研究 [D]. 石家庄: 河北医科大学, 2017.

[责任编辑 李亚楠]