

基于网络药理学和细胞实验探究心脉康片治疗动脉粥样硬化 心血管病的作用机制

张淑颖¹, 陈达满², 叶小汉^{1*}

(1. 广州中医药大学东莞医院, 广东东莞, 523000;
2. 广州中医药大学第四临床医学院, 广东深圳, 518033)

[摘要] 目的:运用网络药理学和细胞实验验证方法研究心脉康片治疗动脉粥样硬化心血管病的潜在药理学作用机制。方法:使用BATMAN-TCM数据库检索心脉康片的组成药物并筛选得到药物活性成分与潜在作用靶标;在GeneCards,人类在线孟德尔遗传数据库(OMIM)检索与动脉粥样硬化相关的疾病靶标;取药物与疾病靶标交集映射获得治疗靶标;将治疗靶标上传至STRING数据库进行蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)网络构建;运用Cytoscape软件制作“药物-活性成分-治疗靶标”网络图,使用网络拓扑算法筛选关键作用靶标;使用DAVID软件进行基因本体(GO)和京都基因与基因组百科全书(KEGG)功能富集分析;使用体外细胞实验方法对药物治疗关键靶点作用进行验证。结果:检索并筛选获得心脉康片药物的活性成分共19个,潜在靶标132个,动脉粥样硬化疾病相关靶标基因4703个,获得交集靶标84个;筛选得到心脉康片治疗动脉粥样硬化疾病的关键治疗靶标3个,包括钙调蛋白1(CALM1),L-型电压依赖钙离子通道A1C亚基(CACNA1C)和磷脂酰肌醇-3-激酶催化亚基 α (PIK3CA);GO富集共得出313条生物学过程,89条分子功能和53条细胞组分;KEGG功能富集共得出40条通路,包括嘌呤代谢,肾素分泌,cGMP/PKG信号通路等。体外细胞实验结果验证心脉康片可上调CALM1,CACNA1C的表达,下调PIK3CA的表达,抑制炎症反应的活性,对动脉粥样硬化疾病起到治疗作用。结论:心脉康片治疗动脉粥样硬化心血管病可能通过白桦脂醇、甲基丁香酚等化合物,经过嘌呤代谢,肾素分泌,cGMP/PKG信号通路等途径,作用于CALM1,CACNA1C,PIK3CA等靶标而发挥作用。

[关键词] 心脉康片; 动脉粥样硬化心血管病; 作用机制; 网络药理学; 细胞实验

[中图分类号] R285;R289;R22;R2-031;R33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2022)03-0196-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20220214

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20211206.1714.001.html>

[网络出版日期] 2021-12-07 13:36

To Explore Mechanism of Xinmaikang Tablets in Treatment of Atherosclerosis Cardiovascular Disease Based on Network Pharmacology and Cell Experiment

ZHANG Shu-ying¹, CHEN Da-man², YE Xiao-han^{1*}

(1. Dongguan Hospital, Guangzhou University of Chinese Medicine, Dongguan 523000, China;
2. Fourth Clinical Medical College, Guangzhou University of Chinese Medicine,
Shenzhen 518033, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the potential pharmacological mechanism of Xinmaikang tablets in the treatment of atherosclerosis cardiovascular disease by using network pharmacology and cell experimental validation. **Method:** The components of Xinmaikang tablets were searched by BATMAN-TCM database and the active ingredients and potential targets were screened. The atherosclerosis related disease targets were searched in GeneCards and online mendelian inheritance in man (OMIM) disease databases. The therapeutic targets were

[收稿日期] 20210819(013)

[基金项目] 广东省中医药局科研项目(20184019)

[第一作者] 张淑颖,在读硕士,从事中西医结合心血管研究,E-mail:993720392@qq.com

[通信作者] *叶小汉,主任中医师,硕士研究生导师,从事中西医结合心血管研究,E-mail: cndgyxh@163.com

obtained by mapping the intersection of the tablets and disease targets. Therapeutic targets were uploaded to STRING database to construct protein-protein interaction(PPI) network. Cytoscape software was used to create a "drug-active component-therapeutic target" network map, and a network topology algorithm was used to screen key action targets. David software was used for gene ontology (GO) and Kyoto encyclopedia of genes and genomes(KEGG) function enrichment analysis. The key targets of drug therapy were validated by *in vitro* cell assay. **Result:** A total of 19 active ingredients, 132 potential targets and 4703 atherosclerotic disease-related target genes of Xinmaikang tablets were retrieved and screened, and 84 intersection targets were obtained. 3 key therapeutic targets of Xinmaikang tablets in the treatment of atherosclerotic diseases were screened, including Calmodulin 1 (CALM1), voltage-dependent L-type calcium channel subunit alpha-1C (CACNA1C) and Phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha isoform (PIK3CA). A total of 313 biological processes, 89 molecular functions and 53 cell components were obtained by GO enrichment. A total of 40 pathways were obtained from KEGG functional enrichment, including purine metabolism, renin secretion, CGMP/PKG signaling pathway and so on. *In vitro* cell experiment results verified that Xinmaikang tablets can up-regulate the expression of CALM1 and CACNA1C, down-regulate the expression of PIK3CA, so as to inhibit the activity of inflammatory response, and play a therapeutic role in atherosclerotic diseases. **Conclusion:** Xinmaikang tablets may treat atherosclerosis cardiovascular disease through betulin, methyleugenol and other compounds, through purine metabolism, renin secretion, cGMP/PKG signaling pathway and other pathways, which acts on CALM1, CACNA1C, PIK3CA and other targets.

[Keywords] Xinmaikang tablets; atherosclerosis cardiovascular disease; mechanism of action; network pharmacology; cell experiment

动脉粥样硬化(AS)是由于脂质沉积于动脉内膜,形成纤维斑块或粥样斑块,导致动脉壁增厚、变硬,动脉管腔狭窄、弹性下降,严重时可导致缺血、血管破裂出血等并发症的一种动脉硬化性疾病。动脉粥样硬化性心血管病(ASCVD)是动脉粥样硬化性疾病的一类分支,包括急性冠状动脉综合征、稳定性冠心病、血运重建术后、缺血性心肌病、缺血性卒中、短暂性脑缺血发作、外周动脉粥样硬化疾病等。动脉粥样硬化类疾病的病理过程基本一致,本病主要累及患者大、中动脉,随年龄增长而逐步进展,40~49岁直接发展较快,通常在中年或中老年时期出现症状^[2]。动脉粥样硬化的症状主要取决于血管病变及受累器官的缺血程度,可发生心绞痛、心肌梗死、脑缺血、脑血管破裂出血等。近年来动脉粥样硬化的发病率在我国呈上升趋势。本病病因尚不明确,一般认为由多种因素累积而成,其主要危险因素包括血脂异常、高血压、吸烟、糖尿病、年龄等。本病发病机制尚未阐明,目前大多学者支持内皮细胞反应学说^[3],认为内皮细胞损伤是发病的始动环节,血脂异常是发病的关键因素,动脉粥样斑块的形成是动脉对内膜损伤做出的反应,也是动脉粥样硬化的基本病理过程。目前现代医学治疗主要采用内科治疗,包括形成良好的生活方式、

忌烟酒、合理膳食、加强体育锻炼等,临床使用降脂、降压药物控制血压、血脂^[1]。西药治疗有较大的不良反应,增加糖尿病、出血风险,停药后易复发。相对来说,中医药治疗临床疗效较为显著,且具有不良反应小的优势,但多为个人经验的总结,缺乏作用机制的相关研究。

根据动脉粥样硬化的病理特点,叶小汉教授创新性地提出了“脉络积”的概念,认为粥样斑块为脉中之积聚,属于微型积证病变,痰瘀是动脉粥样硬化形成的病理基础。气滞血瘀,痰瘀交结为“脉络积”形成动脉粥样硬化的基本病机,治疗上除了重视活血化瘀、益气通脉,还强调软坚散结法的应用。心脉康片^[4]为叶小汉教授治疗动脉粥样硬化心血管病的经验方——软坚散结方组合制成,通过临床对照实验观察证实其在冠心病介入手术的辅助治疗中效果显著。心脉康片药物组成包括鳖甲、三棱、莪术、枳实、胆南星、石斛。其中鳖甲为君药,具有滋阴清热、软坚散结的功用;三棱、莪术破血行气、消积止痛为臣药;枳实破气消积、化痰除痞,制胆星则可清火化痰,二者配伍可消痰以助散结共为佐药;石斛益气养阴扶正为使药。诸药合用,具有软坚散结,益气通脉之功,可减缓乃至消散脉络积证。既往研究已经证实心脉康片联合西药治疗比较单

一西药治疗方法,对高脂血症、动脉粥样硬化和炎症因子、冠脉介入术后再狭窄等的改善作用增强^[5]。

网络药理学基于生命体基因、蛋白之间的相互关联,对生物系统进行复杂网络分析。中药复方治疗具有多成分、多靶标、多途径特征,其作用机制适用于通过网络药理学方法进行分析。本研究致力于运用网络药理学研究思路,建立中药复方药物作用机制网络预测模型,预测药物活性成分与作用靶标,并借助细胞实验进行验证,以阐明心脉康片治疗动脉粥样硬化心血管病的药物作用机制。

1 材料与方法

1.1 药物的活性成分与潜在靶标预测 运用中药分子机制的生物信息学分析工具BATMAN-TCM^[6]数据库(进行心脉康片组成药物的有效活性成分和潜在作用靶标的筛选。分别以药物“鳖甲”“三棱”“莪术”“枳实”“胆南星”“石斛”为检索词,设置筛选条件 Score cutoff=48, P-value=0.05,进行检索,筛选出6味中药的主要活性化学成分,并提取主要活性成分所对应的预测靶标。

1.2 动脉粥样硬化相关靶标和交集靶标获取 使用 GeneCards 基因信息数据库 (<https://www.genecards.org/>)和人类在线孟德尔遗传病数据库(OMIM)(<https://omim.org/>)进行检索,获得动脉粥样硬化相关的目标基因^[7]。以“atherosclerosis”为检索词直接进行检索,得到2个数据库中与动脉粥样硬化相关的疾病靶标结果,下载后对二者结果进行合并,去除二者的重复基因。运用 Venny2.1.0 绘图网站 (<https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>)对药物预测潜在靶标与疾病相关靶标取交集映射,即获得心脉康片治疗动脉粥样硬化的潜在靶标。

1.3 “中药复方-活性成分-治疗靶标”网络构建 使用 Microsoft Excel 2010 软件中的 VLOOKUP 函数将上述心脉康片治疗动脉粥样硬化的潜在靶标与 BATMAN-TCM 数据库检索结果中的活性成分相对应,整理为 Network 表格,并绘制属性表格共同上传至 Cytoscape 3.7.2 软件 (<http://cytoscape.org/>)进行网络可视化分析,调整各节点的位置,美化节点图形、颜色等格式,构建出“中药复方-活性成分-潜在靶标”网络图。

1.4 蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)网络构建 将所得到的心脉康片治疗动脉粥样硬化的潜在治疗靶标基因导入 STRING 在线平台 (<https://string-db.org/>),进行 PPI 分析。设置蛋白质物种为

“homo sapiens”,最低相互作用阈值为“high confidence(0.900)”,并隐藏游离的靶标,其余参数保持默认值,获取 PPI 信息数据列表,保存为 TSV 格式并构建靶标 PPI 网络图^[7]。再将获得的蛋白质基因上传到 Cytoscape 3.7.2 软件进行网络拓扑学分析。

1.5 关键治疗靶标筛选 将上述 TSV 文件列表导入 Cytoscape 3.7.2 软件中进行网络拓扑参数分析。采用 Tools 工具栏中 Network Analyzer 插件对以上结果进行网络拓扑学参数分析。通过度值(degree),中介中心性(betweenness centrality),紧密中心性(closeness centrality)大于等于平均值以上的节点作为关键靶标,此节点作为连接化合物或靶点较多的节点,可在整个网络中起到至关重要的桥梁作用,因此将其作为心脉康片治疗动脉粥样硬化的关键基因靶标,同时构建关键基因的网络结构图。

1.6 GO 分析与 KEGG 通路富集分析 使用 DAVID 生物信息注释数据库 (<https://biit.cs.ut.ee/gprofiler/gost>)进行潜在治疗靶标基因的 GO 分析和 KEGG 通路富集分析。获得心脉康片治疗动脉粥样硬化的生物学过程(BP),细胞组分(CC),分子功能(MF)和相关信号通路信息,并使用 OmicShare 网站 (<http://www.omicshare.com/>),绘制富集基因数排名在前 20 的高级气泡图^[8]。

1.7 细胞实验验证 使用武汉普诺赛(Procell)生命科技有限公司生产的原代分离人主动脉内皮细胞(货号 CP-H080)作为实验细胞,该主动脉内皮细胞系采用胰蛋白酶-胶原酶联合消化法结合差速贴壁法,并通过内皮细胞专用培养基培养筛选制备而来,细胞总量约为 5×10^5 个/瓶;经 CD31 免疫荧光鉴定,纯度可达 95% 以上,且不含有类免疫缺陷病毒 1 型(HIV-1),乙型肝炎病毒(HBV),丙型肝炎病毒(HCV),支原体,细菌,酵母和真菌等。

为保证细胞状态不受传代次数的影响,分别使用第二、第三、第四代传代细胞,与不同质量浓度(0, 0.1, 1, 10 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)的药物共培养,培养时间分别为 12, 24, 48 h^[9]。将上述细胞的蛋白提取物分别用钙调蛋白 1(CALM1)小鼠单克隆抗体, L-型电压依赖钙离子通道 A1C 亚基(CACNA1C)兔单克隆抗体和磷脂酰肌醇-3-激酶催化亚基 α (PIK3CA)兔单克隆抗体(Abcam 公司,货号分别为 ab2860, ab234438, ab40776)以蛋白免疫印迹法(Western blot)检测其蛋白表达情况。使用 Image J V8.0 对图片进行灰度分析,使用 SPSS 25.0 对实验结果进行

单因素方差分析(One-Way ANOVA), $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 药物的活性成分与靶标筛选 通过 BATMAN-TCM 数据库检索得到心脉康片六味组成药物的有效化学成分与对应靶标, 最终获得结果显示, 去重后共得到主要活性化合物 19 个, 共对应 132 个靶标, 见表 1。其中鳖甲含有维生素 D 活性成分, 对应

靶标有 2 个; 三棱包括有桦木酸、山椒醇、白桦脂醇、羽扇豆醇、三棱酸共 5 种活性成分; 莪术包括有新莪术二酮, 原莪术烯醇, 莪术二酮, β -榄香烯 4 种活性成分; 枳实包括有交感醇, 新何帕二烯, *D*-柠檬烯, 菱叶野决明碱 4 种活性成分; 胆南星包括有榄香素、甲基丁香酚、齐墩果酸 3 种活性成分; 石斛包括有 24-羟基-11-去氧甘草次酸、石斛碱 2 种活性成分。

表 1 心脉康药材中活性成分

Table 1 Active ingredients of Xinmaikang tablets

药材	化合物名称	英文名称	靶标频数/次
鳖甲	维生素 D	vitamin d	2
三棱	桦木酸	betulinic acid	10
三棱	山椒醇	sanshool	4
三棱	白桦脂醇	betulin	17
三棱	羽扇豆醇	lupeol	3
三棱	三棱酸	sanleng acid	2
莪术	新莪术二酮	neocurdione	35
莪术	原莪术烯醇	procurcumenol	1
莪术	莪术二酮	curdione	35
莪术	β -榄香烯	beta-elemene	14
枳实	交感醇	synephrine	1
枳实	新何帕二烯	neohopadiene	14
枳实	<i>D</i> -柠檬烯	d-limonene	14
枳实	菱叶野决明碱	rhom bifoline	2
胆南星	榄香素	elemicin	6
胆南星	甲基丁香酚	methyleugenol	8
胆南星	齐墩果酸	oleanolic acid	1
石斛	24-羟基-11-去氧甘草次酸	24-hydroxy-11-deoxyglycyrrhetic acid	1
石斛	石斛碱	dendrobine	3

2.2 动脉粥样硬化相关靶标筛选和交集靶标获取 将在 GeneCards 数据库和 OMIM 数据库检索动脉粥样硬化相关靶标结果合并, 去除重复数据, 共检索到与动脉粥样硬化对应靶标 4 703 个。将心脉康片的潜在靶点和动脉粥样硬化对应靶标上传至 Venny2.1.0 网站, 取交集映射, 共得到 84 个交集靶点, 见增强出版附件材料。

2.3 网络构建

2.3.1 “中药复方-活性成分-潜在治疗靶点”网络 将交集靶点、活性成分、中药信息导入 Cytoscape 3.7.2 软件进行可视化分析处理, 获得“药物-活性成分-潜在治疗靶点”网络图, 见增强出版附件材料。网络共有 107 个节点, 191 条边; 圆形代表靶标, 方形

代表交集化合物, “V”形代表药物, 线段连接表示节点之间具有相关关系。

2.3.2 PPI 网络 将潜在治疗靶点上传至 STRING 在线数据库, 设置蛋白质物种为“homo sapiens”, 最低相互作用阈值为“high confidence(0.900)”, 并隐藏游离的靶标, 其余参数保持默认值, 构建蛋白互作网络, 并将结果导入至 Cytoscape 3.7.2 软件进行可视化处理, 利用插件 Network Analyzer 进行网络拓扑分析, 得出节点的平均度值为 3.344 262 295, 平均中介中心性为 0.106 026 401, 平均紧密中心性为 0.432 227 396; 其中度值在平均值以上的靶标有 21 个, 见表 2。度值、中介中心性、紧密中心性三者均较高的靶点有 CALM1 和 CACNA1C。蛋白互作

网络分析结果显示靶点PIK3CA值较高。CALM1, CACNA1C, PIK3CA可能为心脉康片作用的关键靶点,根据中药-活性成分-作用靶点网络,这些关键点可能分别受到心脉康片药物活性成分白桦脂醇、甲基丁香酚、姜黄二酮的调控。

表2 心脉康片的主要作用靶标

Table 2 Main targets of Xinmaikang tablets

靶标名称	度值	靶标名称	度值
PIK3CA	12	ADRA2B	5
PIK3R1	11	ADRA2C	5
NR3C1	7	ADRB2	5
CALM1	7	CHRM3	5
ADORA1	6	ADRA1D	5
CHRM2	6	AR	5
ADRA1B	6	PGR	5
PTGER1	6	ALDH2	4
ESR1	6	CACNA1C	4
ADRA2A	5	CYP19A1	4
CX3CR1	5		

2.4 富集分析

2.4.1 GO富集分析 为进一步阐明交集靶点的潜在作用,本研究通过对交集靶点进行富集分析。运用David数据库对心脉康片的潜在治疗靶点进行GO生物学过程富集分析。GO包括生物学过程(BP),分子功能(MF)以及细胞组分(CC),共富集到455条GO条目,其中包括313条生物学过程,89条分子功能和53条细胞组分;纵轴代表通路名字,横轴代表基因比率(Gene Ratio)。气泡越大代表该通路基因富集数量越多,气泡颜色偏红色代表富集程度越显著,即P值越小。其中BP条目排在前位的有血液循环调节、肌肉收缩的调节、心脏收缩,提示药物的作用可能与对心肌收缩运动、血液循环的调节有关。MF条目主要结果为磷酸酯水解酶活性、金属离子跨膜转运活性和被动跨膜转运蛋白活性等等,提示药物的功能可能与跨膜转运、酶的激活相关。排在前位的CC条目是跨膜转运复合体,离子通道复合体等等。

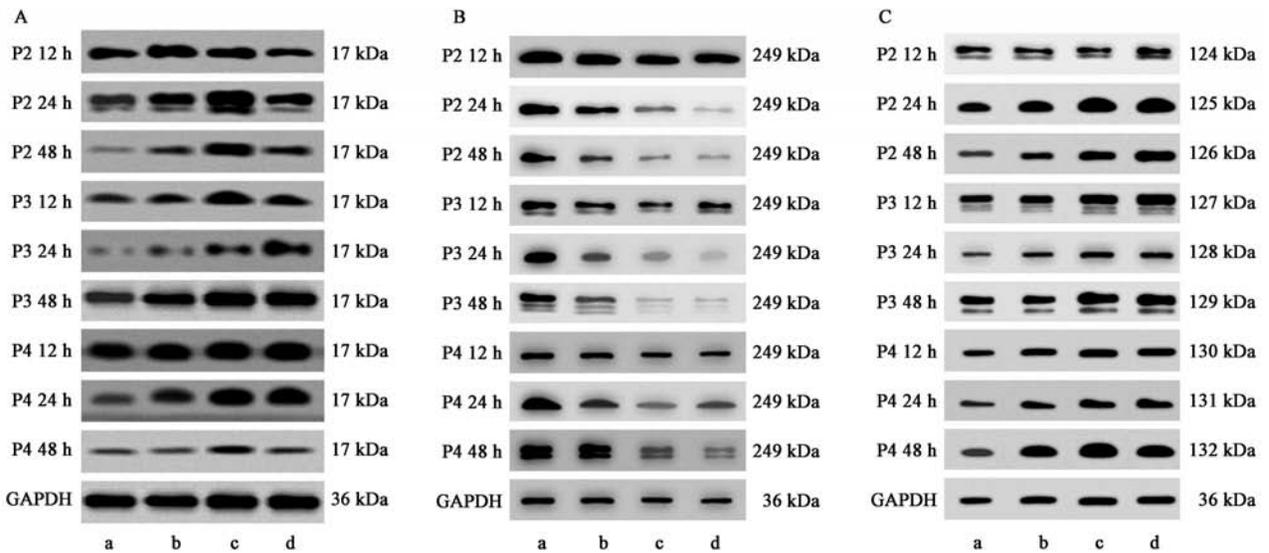
2.4.2 KEGG富集分析 将心脉康片治疗动脉粥样硬化作用靶点上传至DAVID数据库中,进行KEGG通路富集分析,共富集到40条通路,其中排名前20的通路见增强出版附件材料,主要为嘌呤代谢,肾素分泌,cGMP/PKG信号通路,cAMP信号通路,胆碱能突触,促性腺激素分泌,雌激素信号通路等。

2.5 实验结果 实验结果显示,心脉康片药物干预人主动脉内皮细胞48 h内,与空白组相比,心脉康片0.1, 1, 10 mg·L⁻¹组的糖皮质激素受体蛋白CALM1, CACNA1C表达显著升高,且1 mg·L⁻¹剂量组的表达增幅量最大。磷酸激酶受体蛋白PIK3CA的表达下降,且心脉康片1 mg·L⁻¹组的表达下降幅度最大。心脉康片0.1, 1, 10 mg·L⁻¹组与空白组比较, CALM1, PIK3CA, CACNA1C蛋白表达均存在统计学差异(P<0.05),说明心脉康片对关键靶点CALM1, PIK3CA, CACNA1C蛋白表达具有显著的调控作用。见图1,表3。

3 讨论

动脉粥样硬化是冠心病、脑梗死等心脑血管疾病的主要发病原因。动脉粥样硬化以脂质代谢障碍为病理基础^[10],胆固醇和脂蛋白长期对动脉内皮产生损伤,单核细胞黏附并移入内膜下成为巨噬细胞,再转变为泡沫细胞形成脂质条纹,在多种生长因子的共同作用下脂肪条纹演变发展为纤维斑块,导致动脉壁的增厚变硬、管腔狭窄,甚至造成动脉管腔阻塞,导致该动脉供应组织或器官的缺血坏死。动脉粥样硬化类疾病具有发病率高、致残率高、致死率高等特点,在临床逐渐引起人们的重视。动脉粥样硬化为现代病理学概念,中医学中无“动脉粥样硬化”病名,根据其眩晕、头痛、胸闷、气短、心悸等临床症状表现,可以归属为“胸痹”“心痛”“脉痹”“眩晕”等病症范畴^[11]。中医认为本病可由禀赋不足、年老体衰、感受外邪、七情内伤、饮食不节、劳逸失常等多种病因综合导致。本病病机属于本虚标实,既有肝、脾、肾脏腑不足,又有痰湿、瘀血、热毒实邪阻滞。临床上多见脾虚湿盛、肝肾阴虚、气滞血瘀、湿热内蕴等证型,分别处以益气健脾、化痰祛湿、补益肝肾、调肝理气、活血化瘀、清热解毒治法^[12],体现中医药在防治动脉粥样硬化中辨证论治的特色思维。

叶小汉教授创新性地提出软坚散结法治动脉粥样硬化的理论,该理论通过大量的临床案例和实验研究被证实疗效确切^[13]。“痰瘀”为动脉粥样硬化的基本病理因素^[14],活血化瘀消痰、软坚散结的治法可以延缓“痰瘀”的发展。基于此叶小汉教授配制出治疗动脉粥样硬化的专用制剂——心脉康片。该片剂由鳖甲、三棱、莪术、枳实、胆南星、石斛6味药组成。其中鳖甲可软坚散结、潜阳熄风,并能滋阴清热。现代药理研究证实本品有强健身体、抗疲劳和免疫促进作用,能抑制结缔组织的增生、消



A. 白桦脂醇(Betulin)对蛋白CALM1表达的影响;B. 姜黄二酮(Curdione)对蛋白PIK3CA表达的影响;C. 甲基丁香酚(Methyleugenol)对蛋白CACNA1C表达的影响;a,b,c,d.0,0.1,1,10 mg·L⁻¹;P2-4为细胞代数(2~4代);12,24,48 h为3个不同的处理时间

图1 心脉康片对人主动脉内皮细胞细胞蛋白CALM1,PIK3CA和CACNA1C表达的影响

Fig. 1 Effect of Xinmaikang tablets on human aortic endothelial cell protein CALM1,PIK3CA and CACNA1C expression

表3 心脉康片对人主动脉内皮细胞细胞蛋白CALM1,PIK3CA和CACNA1C表达的影响

Table 3 Effect of Xinmaikang tablets on human aortic endothelial cell protein CALM1, PIK3CA and CACNA1C expression

组别	剂量 /mg·L ⁻¹	CALM1 /GAPDH	PIK3CA /GAPDH	CACNA1C /GAPDH
心脉康片	0.1	1.22±0.20 ¹⁾	0.74±0.20 ¹⁾	1.26±0.18 ¹⁾
	1	1.60±0.30 ²⁾	0.51±0.24 ²⁾	1.53±0.29 ²⁾
	10	1.49±0.27 ²⁾	0.48±0.29 ²⁾	1.57±0.26 ²⁾

注:设空白组相关蛋白表达为1;与空白组比较¹⁾P<0.05,
²⁾P<0.01。

除结块^[15]。三棱、莪术功能破血行气、消积止痛。实验已发现荆三棱具有对血小板聚集功能的抑制作用^[16]。有研究发现莪术^[17]增加股动脉血流量的作用在活血化瘀药中最为明显,以莪术油注射液静脉滴注治疗血栓闭塞性脉管炎的血瘀患者疗效显著。枳实、胆南星为化痰软坚之品。现代药理研究发现枳实^[18]具有明显的抗血栓、抗血小板聚集、降低红细胞聚集的作用。另外,杨中林等^[19]在凝血实验中表明,天南星炮制品的水浸液有显著延长小鼠凝血时间的作用。石斛用以益胃生津,滋阴扶正。全方共奏活血化痰、软坚消积之效。

本研究基于网络药理学方法,筛选出心脉康片六味中药包括白桦脂醇,羽扇豆醇、桦木脂素, β -榄香烯,D-柠檬烯,齐墩果酸等共19个活性成分。其中白桦脂醇^[20]被证实有抑制感染的作用且不伤害

健康细胞。在动物实验中羽扇豆醇能有效抵御氧化、减轻炎症^[21];桦木脂素是一种五环三萜,在实验中证实具有降低胆固醇积聚的作用,能抑制动脉窦内巨噬细胞,促进巨噬细胞的胆固醇外流,缓解小鼠的动脉粥样硬化。研究发现 β -榄香烯^[22]也能减少巨噬细胞对胆固醇的摄取,降低泡沫细胞内的总胆固醇,还可避免血栓形成,改善血液流变学功能,改善炎症状态,起到延缓动脉粥样硬化的作用^[23]。D-柠檬烯通过抑制3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶A还原酶(HMG-CoA)活性,减慢胆固醇生成。众多研究表明齐墩果酸具有广泛的抗氧化、降低血压、血糖、保护心脑血管、抗动脉粥样硬化的作用^[24-25]。

本研究共获得132个该药对治疗动脉粥样硬化的潜在作用靶点,动脉粥样硬化的相关靶标基因有4703个,心脉康片与动脉粥样硬化预测靶标取交集映射共获得84个交集靶标。本研究中预测的多种潜在作用靶点与动脉粥样硬化机制相关,其中有磷酸激酶受体PIK3CA,PIK3R1,腺苷受体ADORA1,糖皮质激素受体NR3C1,CALM1,NR3C1,神经递质类受体有乙酰胆碱受体CHRM2,肾上腺素受体ADRA1B,ADRA2A等。碱性磷酸酶几乎可以催化所有的磷酸单酯的水解反应,生成无机磷酸和相应的醇、酚、糖等。比如野生型p53诱导的磷酸酶(Wip1)可参与多种炎症相关疾病的免疫调节,文献报道其可能通过影响巨噬细胞迁移、平滑肌细胞增

生参与动脉粥样硬化过程^[26]。研究发现PHPS1(特异性抑制剂苯肼基吡唑啉酮磺酸盐1)可激活细胞外信号调节酶及磷脂酰肌醇3激酶信号通路,增强巨噬细胞对胆固醇的吞噬能力,促进泡沫细胞形成、加剧动脉粥样硬化进展^[27]。研究也表明血清碱性磷酸酶水平与心脑血管疾病风险呈正相关^[28]。腺苷作为人体细胞的内源性核苷,可进入心肌,通过磷酸化生成腺苷酸,参与心肌能量代谢,还具有扩张冠脉血管、增加血流量的作用。临床实验证明曲美他嗪联合三磷酸腺苷能有效改善心功能和心力衰竭症状,治疗冠状动脉粥样硬化性心脏病^[29]。糖皮质激素具有广泛的抗炎、抗过敏、抑制免疫等多种作用,能抑制B细胞转化,阻止抗体的生成,干扰淋巴组织增殖,阻断单核细胞和巨噬细胞,有效减缓免疫性炎症反应和病理性免疫反应的发生^[30],并且能扩张血管和兴奋心脏,用以治疗心血管疾病。肾上腺素可以加强心脏收缩力,扩张心肌血管。低雌激素水平下可诱导动脉内中膜增厚、促进斑块形成,进而引发动脉粥样硬化^[31-32]。研究发现激动 β_3 -AR具有调节脂代谢,改善心功能的作用,改善心血管疾病。

KEGG通路富集结果显示,嘌呤代谢,肾素分泌,cGMP/PKG信号通路,cAMP信号通路,胆碱能突触,促性腺激素分泌通路富集的基因数较多,与研究预测靶点结果不谋而合。这些通路可能是药物活性成分作用的主要途径。嘌呤代谢,cGMP/PKG信号通路,cAMP信号通路通过影响腺苷代谢对疾病发生发展产生作用,且肾素分泌、胆碱能突触、促性腺激素分泌也与上文研究预测靶点结果不谋而合,具体药理作用不再赘述。

本研究筛选获得的关键靶点包括CALM1,PIK3CA,CACNA1C,根据“药物-化合物-靶点”网络图,这些靶点分别主要受到药物化合物白桦脂醇、姜黄二酮、甲基丁香酚的调控。通过细胞实验结果表明,药物干预下关键靶点CALM1,PIK3CA,CACNA1C蛋白表达水平发生显著改变,传代细胞糖皮质激素受体蛋白CALM1与CACNA1C表达显著升高,CALM1与CACNA1C蛋白皆具有抑制炎症反应的活性;磷酸激酶受体蛋白PIK3CA表达降低,均可对动脉粥样硬化疾病起到治疗作用。

综上所述,本研究借助网络药理学方法阐明了心脉康片治疗动脉粥样硬化心血管疾病作用机制中药物化合物与作用靶点的网络关系,反映了心脉康片治疗动脉粥样硬化疾病多成分、多靶点、多通路

的机制特点。筛选出心脉康片主要活性成分与主要作用靶点,并通过细胞实验验证了药物活性成分对关键靶点CALM1,PIK3CA,CACNA1C蛋白表达的调控作用。从而在作用机制层面验证了叶小汉教授自创院内制剂心脉康片在动脉粥样硬化心血管病的临床治疗作用,有助于推广该药物在临床上的使用,提高动脉粥样硬化疾病的治疗效果。然而基于中药作用的复杂性,药物其他相关作用机制还有待进行进一步的广泛研究。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] 梁宾,郑芳. 单核细胞亚型在动脉粥样硬化性心脏病中的研究进展[J]. 武汉大学学报:医学版,2021,doi: 10.14188/j.1671-8852.2019.0549.
- [2] 张会军,吕清,张允,等. 症状性动脉粥样硬化性非急性颅内大动脉闭塞治疗进展[J]. 世界临床药物,2021,42(7):523-527.
- [3] 张蕾,刘佳丽,蔺琳,等. 剪切力对动脉粥样硬化的影响及中药抗剪切力损伤的研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志,2021,27(18):234-242.
- [4] 谭展飞,李浩,马晓昌,等. 基于“心-肠”轴理论重塑肠道菌群干预动脉粥样硬化的研究进展[J]. 中药药理与临床,2021,doi: 10.13412/j.cnki.zyyj.20210825.004.
- [5] 侯焯均,陈建兴,赖惠东,等. 心脉康联合阿托伐他汀对急性冠脉综合征患者疗效及血脂的影响[J]. 深圳中西医结合杂志,2021,31(6):54-56.
- [6] 李煜,张毅,徐核,等. 基于网络药理学的芩暴红止咳口服液抗炎、止咳、祛痰、平喘的作用机制研究[J]. 中国中药杂志,2021,doi: 10.19540/j.cnki.cjcmm.20210811.401.
- [7] 卢鑫,张馨月,林逸婷,等. 基于网络药理学一分子对接探讨四逆散“异病同治”溃疡性结肠炎和肠易激综合征的作用机制[J]. 中药药理与临床,2021,doi: 10.13412/j.cnki.zyyj.20210806.010.
- [8] 孟天伟,姜楠,杨欣欣,等. 川芎抗动脉粥样硬化作用机制的网络药理学与分子对接技术研究[J]. 中国动脉硬化杂志,2021,29(9):761-769.
- [9] 张彦燕,何丽,黄梅,等. 红景天苷抑制Hcy诱导的血管内皮细胞氧化应激损伤的实验研究[J]. 西南民族大学学报:自然科学版,2020,46(4):349-353.
- [10] 田进伟,符亚红. 动脉粥样硬化易损斑块快速进展机制与临床治疗进展[J]. 中国动脉硬化杂志,2019,27(4):277-280.
- [11] 尤俊方,张卿,苏海燕,等. 中医体质与动脉粥样硬化性心血管疾病及其防治的研究进展[J]. 内蒙古中医

- 药, 2021, 40(7): 163-165.
- [12] 刘超, 甘佳乐, 白忠旺, 等. 中医药治疗冠心病心绞痛研究进展[J]. 国医论坛, 2021, 36(4): 76-78.
- [13] 陈丽萍. 软坚散结法防治痰瘀交结型DVT54例临床疗效观察[D]. 广州: 广州中医药大学, 2019.
- [14] 周建馨, 叶小汉. 软坚散结法治疗痰瘀交结型高脂血症性脂肪肝的临床疗效观察[J]. 广州中医药大学学报, 2020, 37(1): 19-24.
- [15] 张文富, 肖友生, 黄晶晶, 等. 鳖甲煎丸对急性缺血性脑卒中患者的疗效、颈动脉粥样硬化斑块形成及血清炎症因子水平的影响[J]. 广西医学, 2019, 41(3): 281-284.
- [16] 陶斯腾. 三棱内酯B和姜黄素对动脉粥样硬化的影响及其作用机制的研究[D]. 长春: 吉林大学, 2020.
- [17] 陈晓军, 韦洁, 苏华, 等. 莪术药理作用的研究新进展[J]. 药学研究, 2018, 37(11): 664-668, 682.
- [18] 王思文. 枳椇舒心颗粒预处理对模型动物血液流变学及血栓形成的影响[D]. 长春: 长春中医药大学, 2018.
- [19] 韦英杰, 杨中林. 天南星研究进展[J]. 时珍国医国药, 2001(3): 264-267.
- [20] JELONEK K, KACZMARCZYK B, ORCHEL A, et al. Correlation between the composition of PLA-based folate targeted micelles and release of phosphonate derivative of betulin[J]. J Drug Delivery Sci Technol, 2021, 65.
- [21] JIANG Y, HONG D, LOU Z, et al. Retraction note to: Lupeol inhibits migration and invasion of colorectal cancer cells by suppressing RhoA-ROCK1 signaling pathway[J]. N-S Arch Pharmacol, 2021, doi: 10. 1007/s00210-021-02122-1.
- [22] 董庆磊, 尹铁英, 王贵学. β -榄香烯在抗动脉粥样硬化及再狭窄方面的潜在应用[J]. 生物医学工程学报, 2013, 30(3): 656-660.
- [23] 段文丽, 白仁仁, 钟颖, 等. β -榄香烯对RAW264.7巨噬细胞源性泡沫细胞作用的研究[J]. 现代生物医学进展, 2014, 14(31): 6014-6018.
- [24] 李文倩. 齐墩果酸经FGF₂/JNK/PON2通路抑制ox-LDL诱导的大鼠血管平滑肌细胞增殖[D]. 青岛: 青岛大学, 2018.
- [25] 谢保平, 陈治希, 赵玥, 等. 齐墩果酸在心脑血管疾病防治中的研究进展[J]. 赣南医学院学报, 2019, 39(12): 1201-1206, 1257.
- [26] 张颖怡, 潘兵, 王宏宇. 野生型p53诱导的磷酸酶调节炎症和动脉粥样硬化研究进展[J]. 中华临床医师杂志: 电子版, 2020, 14(9): 721-724.
- [27] 马倩, 路永刚, 李新新, 等. 蛋白酪氨酸磷酸酶SHP-2特异性抑制剂PHPS1通过促进泡沫细胞形成加速apoE-基因敲除小鼠早期动脉粥样硬化进展[J]. 河北医科大学学报, 2020, 41(6): 709-714, 719.
- [28] 韩曼云, 梁冰. 血清碱性磷酸酶在心脑血管疾病中的临床应用研究进展[J]. 中外医疗, 2019, 38(30): 196-198.
- [29] 隋欣桐. 曲美他嗪联合三磷酸腺苷对老年冠状动脉粥样硬化性心脏病合并心力衰竭患者血清脂联素及心功能的影响[J]. 中国药物经济学, 2021, 16(1): 56-59.
- [30] 杨晓倩, 秦莉, 张艺文, 等. 糖皮质激素与心血管疾病[J]. 心血管病学进展, 2020, 41(4): 404-407.
- [31] 雷震山, 张琨, 高鹏, 等. 女性雌激素水平与颈动脉内中膜增厚的关系[J]. 中国城乡企业卫生, 2018, 33(6): 4-6.
- [32] 蓝洋, 王宏宇. 雌激素水平与血管相关疾病[J]. 心血管病学进展, 2019, 40(4): 529-532.

[责任编辑 顾雪竹]