引用:肖满,龚年春,李鹏辉,孙瑜,彭艳梅,章泽恒. 基于网络药理学探讨养心定悸膏抗心律失常的分子机制[J]. 湖南中医杂志,2023,39(5):154-160.

基于网络药理学探讨养心定悸膏抗心律失常的分子机制

肖 满[1],龚年春[2],李鹏辉[2],孙 瑜[2],彭艳梅[2],章泽恒[3]
(1. 湖南中医药大学,湖南 长沙,410208;
2. 湖南省中医药研究院,湖南 长沙,410006;
3. 湖南省药品审评认证与不良反应监测中心,湖南 长沙,410013)

[**摘要**] 目的:基于网络药理学探讨养心定悸膏抗心律失常的分子机制。方法:检索 TCMSP、BATMAN-TCM 等数据库及国内外文献,筛选获得活性成分及其对应靶点;检索 GeneCards、OMIM 等数据库获得疾病相关靶点;采用 STRING 分析靶点蛋白的互作关系;利用 Cytoscape 3.9.1 软件构建并合并活性成分靶点及疾病靶点相互作用关系网络,通过网络拓扑分析筛选出关键基因,并对核心靶点进行基因本体(GO)功能和京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路富集分析。结果:检索到 139 种活性成分,预测靶点 780 个,疾病靶点 5066 个,交集靶点 412 个,核心靶点 10 个,包括胰岛素(INS)、血管内皮生长因子 α(VEGFA)、胱氨酸蛋白酶 3(CASP3)、白蛋白(ALB)、活化蛋白-1 的转录因子(JUN)等。GO 功能富集分析得到对无机物的反应、神经递质受体活性、突触膜等条目。获得 KEGG 信号通路 222 条,主要包括神经活性配体-受体相互作用、神经退行性变、cGMP-PKG 等。结论:本研究揭示了养心定悸膏可通过多成分、多靶点作用于神经活性配体-受体相互作用,钙、氨基酸代谢,cGMP-PKG 等多通路治疗心律失常。

[**关键词**] 心律失常;养心定悸膏;网络药理学;分子机制
[**中图分类号**]R259.417 [**文献标识码**]A DOI:10.16808/j.cnki.issn1003-7705.2023.05.038

Molecular mechanism of Yangxin Dingji ointment in treatment of arrhythmia: A study based on network pharmacology

XIAO Man[1],GONG Nianchun[2],LI Penghui[2],SUN Yu[2],PENG Yanmei[2],ZHANG Zeheng[3]
(1. Hunan University of Chinese Medicine,Changsha 410208,Hunan,China;
2. Hunan Academy of Chinese Medicine,Changsha 410006,Hunan,China;
3. Hunan Center for Drug Evaluation and ADR Monitoring,Changsha 410013,Hunan,China)

[**Abstract**] Objective:To investigate the molecular mechanism of Yangxin Dingji ointment anti-arrhythmia based on network pharmacology. Methods:Databases including TCMSP and BATMAN-TCM and related articles in China and globally were searched to obtain active components and their corresponding targets;databases such as GeneCards and OMIM were searched to obtain disease-related targets;STRING database was used to analyze the interaction between target proteins. Cytoscape 3.9.1 was used to construct and combine the interaction networks of active component targets and disease targets,the network topology analysis was used to identify core genes,and gene

基金项目:湖南省自然科学科药联合基金项目(2021JJ80048);湖南省重点领域研发计划重点研究项目(S2021GCZDYF0795);"十四五"科技创新平台中医药名医名方制剂重点研究室;湖南省芙蓉实验室中药制剂关键技术研发平台

第一作者:肖满,女,2020 级硕士研究生,研究方向:中药学
通信作者:彭艳梅,女,研究员,研究方向:中药创新药与大健康产品研发 ,E-mail:271853145@qq.com
章泽恒,男,副主任药师,研究方向:药学,E-mail:719563428@qq.com

ontology (GO) functional enrichment analysis and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway enrichment analysis were performed for the core targets. Results: The above analyses obtained 139 active components, 780 predictive targets, 5066 disease targets, 412 intersecting targets, and 10 core targets, including INS, VEGFA, CASP3, ALB, and JUN. GO functional enrichment analysis obtained the terms such as response to inorganic substance, neurotransmitter receptor activity, and synaptic membranes. KEGG pathway enrichment analysis obtained 222 signaling pathways, mainly including neuroactive ligand-receptor interaction, neurodegeneration, and cGMP-PKG. Conclusion: This study reveals that Yangxin Dingji ointment may exert a therapeutic effect on arrhythmia through multiple components and targets by acting on various pathways such as neuroactive ligand-receptor interaction, calcium/amino acid metabolism, and cGMP-PKG.

[**Keywords**] arrhythmia; Yangxin Dingji ointment; network pharmacology; molecular mechanism

心律失常是指由于心脏跳动的起源部位、频率、节律、传导速度或激动次序异常而引起的一系列临床综合征。其中，按发生部位可分为室上性与室性，按发生时心率的快慢可分为快速型和缓慢型[1]，可单独发生，也可与其他心血管疾病伴发。据调查，2015 年农村心脏病病死率为 0.145%，城市心脏病的病死率为 0.137%，其中每年死于心律失常的患者可达上万人[2]。目前，西医治疗心律失常的主要方法包括手术及药物治疗，但都具有较大的局限性及毒副作用。如心房颤动导管消融术的并发症发生率达 6.29%[3-4]。“治”心律失常药物存在“致”心律失常的毒副作用，使原有心律失常加重或诱发新的心律失常，引起房室传导阻滞、窦性停搏等，严重时可导致死亡，同时还存在经济负担过重等问题。

心律失常属于中医学“心悸”范畴，中医学对其的研究历史深远、经验丰富。基于不同的病因病机采取相应的经方治疗策略。养心定悸膏由经典方炙甘草汤化裁而来，其药物组成为炙甘草、生地黄、阿胶、红参、大枣、麦冬、黑芝麻、桂枝、生姜，具有益气养血、复脉定悸的功效，对于气血两虚、阴阳失调所致的心律失常有较好的疗效[5]。在机制方面，炙甘草汤研究颇多[6-8]。而养心定悸膏相关研究相对较少，主要与抗氧化应激[9]、调控磷脂酰肌醇 3-激酶/蛋白激酶 B/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(PI3K/AKT/mTOR)信号通路[10]等有关。目前，对于养心定悸膏抗心律失常的整体分子机制尚不明确。

网络药理学可通过数据库检索、数据分析及虚拟计算和网络构建预测药物潜在有效成分及核心靶点，其系统性、多样性等特点与中医药的整体观相吻合[11]。故本文基于网络药理学的方法分析养心定悸膏抗心律失常的分子机制，以期为后续实验研究提供理论参考。

1　资料与方法

1.1　养心定悸膏有效成分及靶点的筛选　通过检索中药系统药理学数据库与分析平台(TCMSP)数据库(http://www.tcmspw.com/tcmsp.php)、中药分子机制的生物信息学分析工具(BATMAN-TCM)数据库(http://bionet.ncpsb.org/batman-tcm/)，以口服生物利用度(OB)≥30%、类药性(DL)≥0.18 进行养心定悸膏活性成分及其作用靶标的筛选。筛选结束后在 UniProt 数据库(https://www.uniprot.org)将化合物作用靶标进行基因名的转化和规范。

1.2　养心定悸膏与心律失常靶点的收集与筛选　利用 GeneCards (https://www.genecards.org/)、OMIM(http://www.omim.org/)数据库，以“arrhythmia”“Heart palpitations”为关键词进行检索，删除重复靶点，得到疾病靶点，在 UniProt 数据库中将疾病基因靶点进行规范。利用 Venny 2.1 在线工具绘制韦恩图，并获得交集靶点。

1.3　中药有效成分-靶点-疾病网络的构建　将有效成分、靶点及疾病关系导入网络图像化软件 Cytoscape 3.9.1 以完成相关网络构建，其中用“节点”(node)表示药物、分子、靶点、疾病，用“边”(edge)表示节点之间的关系。

1.4　蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)网络的构建　根据交集靶点利用 STRING 平台(https://string-db.org/)建立 PPI 网络并导入 Cytoscape 3.9.1 软件

中,通过网络拓扑分析得出度值(degree)和紧密值(combined scores),同时利用 CytoHubba 插件进行 MCC 运算得出网络中连接最为紧密的子网络和核心靶点。

1.5 基因本体(GO)功能和京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路富集分析 利用 Metascape(https://metascape.org/)输入交集靶点,对共有靶点进行 GO 功能富集分析和 KEGG 通路富集分析,其中 GO 功能富集分析包括生物过程(BP)、细胞组成(CC)和分子功能(MF),预测靶点的功能分布,P 值均设定为<0.01。

2 结 果

2.1 中药有效成分及靶点的获取 共获得重复成分 6 种。根据 OB 和 DL 参数,利用相关靶点预测技术进行作用靶点预测,并用 UniProt 数据库进行规范后,共检索到 139 种活性成分,其中红参 2 种、大枣 14 种、芝麻 6 种、桂枝 3 种、生姜 2 种、甘草 82 种、阿胶 3 种、麦冬 17 种、生地黄 4 种,重复成分 6 种。获得预测靶点 780 个。

2.2 中药-疾病靶点的获取 共检索到 5100 个靶点,删除重复靶点后,在 UniProt 数据库将疾病基因靶点进行规范,得到总靶点数 5066 个。利用 Venny 2.1 在线工具绘制养心定悸膏活性成分靶点与心律失常相关靶点的韦恩图,并得到交集靶点 412 个。(见图 1)

2.3 中药有效成分-靶点-疾病网络的分析 构建的网络共获得 925 个节点和 2079 个关系。根据 degree 值大小排序,确定养心定悸膏中排前 20 位发挥抗心律失常作用的重要成分主要包括赖氨酸、γ-氨基丁酸、槲皮素、豆甾醇、β-谷甾醇、尿苷、鸟嘌呤核苷、山柰酚、甲基麦冬酮 B 等。(见表 1、图 2)

2.4 PPI 网络的构建与核心靶点的筛选 获得 10 个核心靶点,包括胰岛素(INS)、血管内皮生长因子 A、胱天蛋白酶 3、白蛋白(ALB)、原癌基因蛋白(JUN)、丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶(AKT1)、缺氧诱导因子 1α(HIF1A)、黏着连接蛋白 β1(CTNNB1)、白介素-6(IL-6)、人表皮生长因子受体(EGFR)。(见图 3)

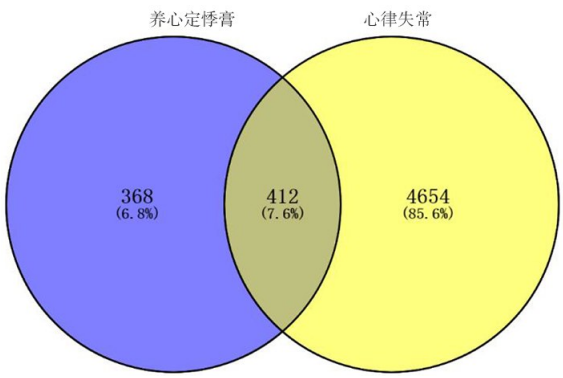

图 1 养心定悸膏活性成分靶点与心律失常相关靶点韦恩图

表 1 养心定悸膏抗心律失常化学成分及归属药分析(前 20 位)

编号	活性成分	药物	degree 值	编号	活性成分	药物	degree 值
EJ1	Lysine	阿胶	391	GC6	Isorhamnetin	甘草	18
SDH2	Gamma-Aminobutyric Acid	生地黄	205	MD17	Orchinol	麦冬	17
C1	Quercetin	大枣、甘草	150	GC8	7-Methoxy-2-methyl isoflavone	甘草	16
B1	Stigmasterol	大枣、生姜、麦冬	148	GC63	2-[(3R)-8,8-dimethyl-3,4-dihydro-2H-pyrano[6,5-f]chromen-3-yl]-5-methoxyphenol	甘草	15
A1	Beta-sitosterol	大枣、桂枝、生姜	68	GC61	Licochalconea	甘草	15
MD4	Uridine	麦冬	44	GC47	Glabridin	甘草	15
MD7	Guanosine	麦冬	38	GC12	Naringenin	甘草	15
GC11	Kaempferol	甘草	34	GC77	Licoagrocarpin	甘草	14
MD11	Methyl Ophiopogonanone B	麦冬	26	GC62	3′-Methoxyglabridin	甘草	13
MD6	Ophiopogonanone E	麦冬	26				
EJ2	Arginine	阿胶	19				

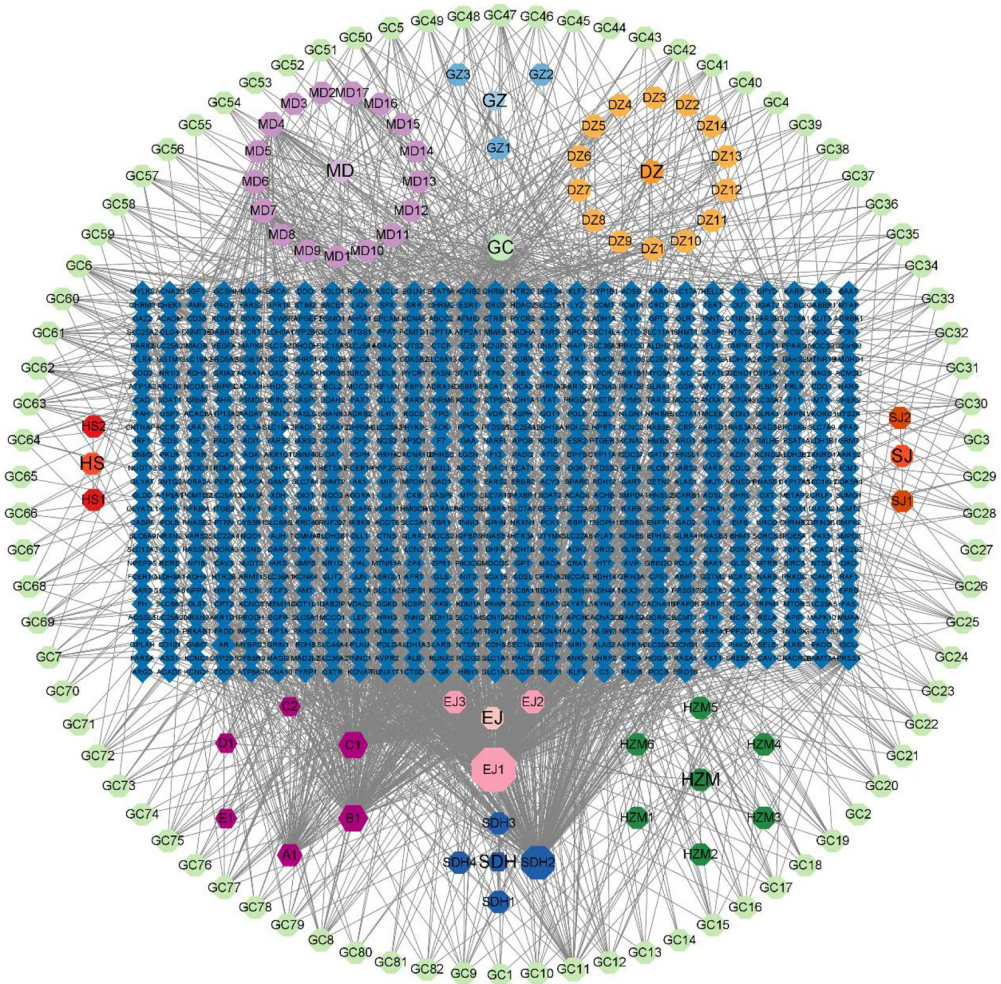

图 2　中药成分-靶点-疾病网络图

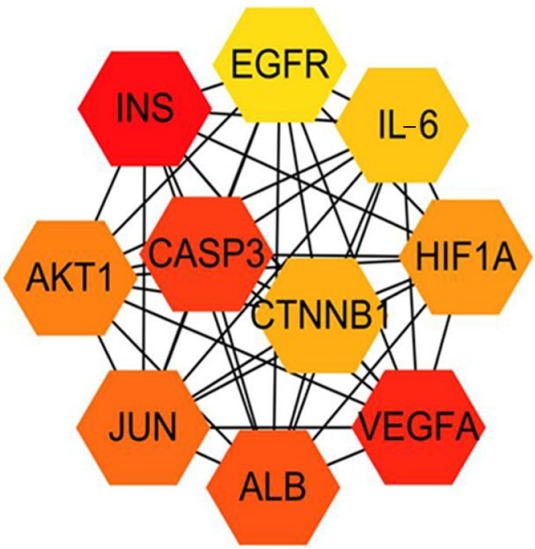

图 3　核心靶点 PPI 网络图(前 10 位)

2.5　GO 功能、KEGG 通路富集分析　Metascape 平台拥有全面的注释功能并且每月更新基因注释的数据资料[12-13]。图 4 显示，养心定悸膏抗心律失常主要参与的 BP 包括细胞对系统过程的调节(Regulation of system process)、对无机物的反应(Response to inorganic substance)、对氮化合物的反应(Cellular response to nitrogen compound)、对外来生物刺激的反应(Response to xenobiotic stimulus)、激素水平的调节(Regulation of hormone levels)等有关。MF 主要富集于氧化还原酶活性(Oxidoreductase activity)、神经递质受体活性(Neurotransmitter receptor activity)等。主要参与的 CC 包括突触膜(synaptic membrane)、膜筏(Membrane raft)、离子通道络合物(Ion channel complex)等。KEGG 富集分析结果显示，养心定悸膏抗心律失常涉及参与的信号通路包括神经活性配体-受体相互作用、钙离子通道、氨基酸代谢、环磷酸鸟苷-环鸟苷酸依赖性蛋白激酶(cGMP-PKG)等。(见图 5、表 2)

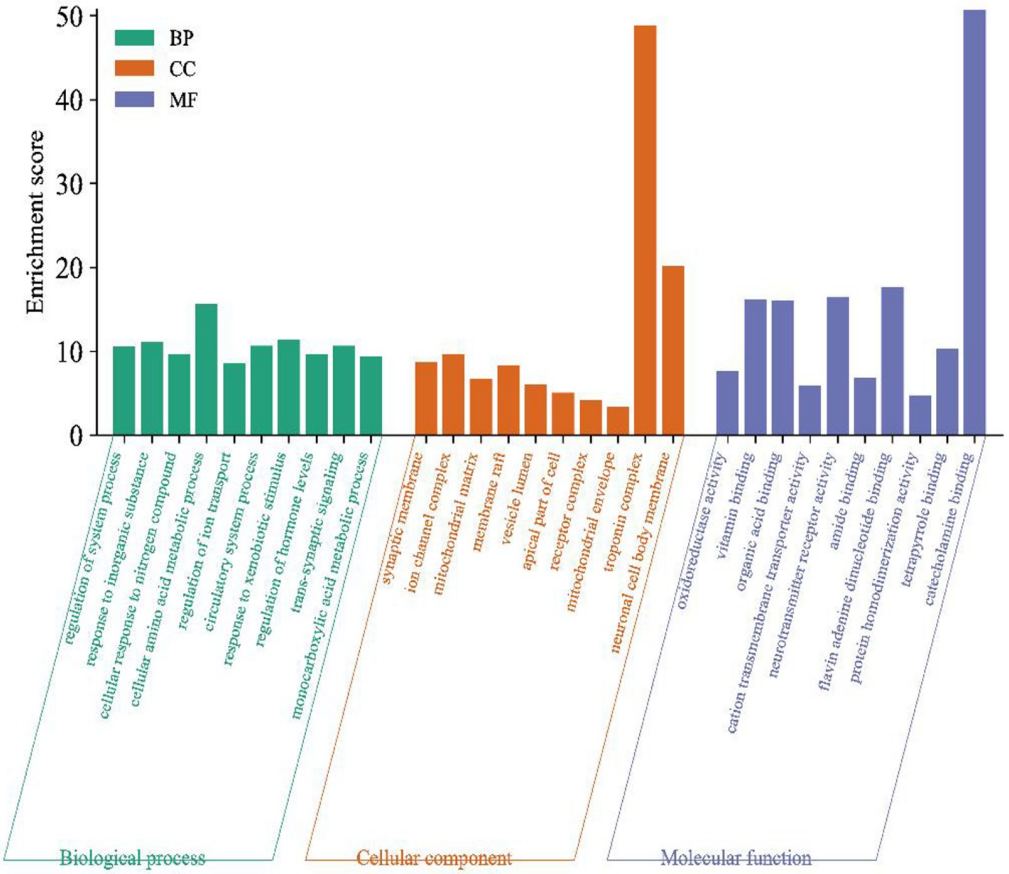

图 4　GO 功能富集分析图

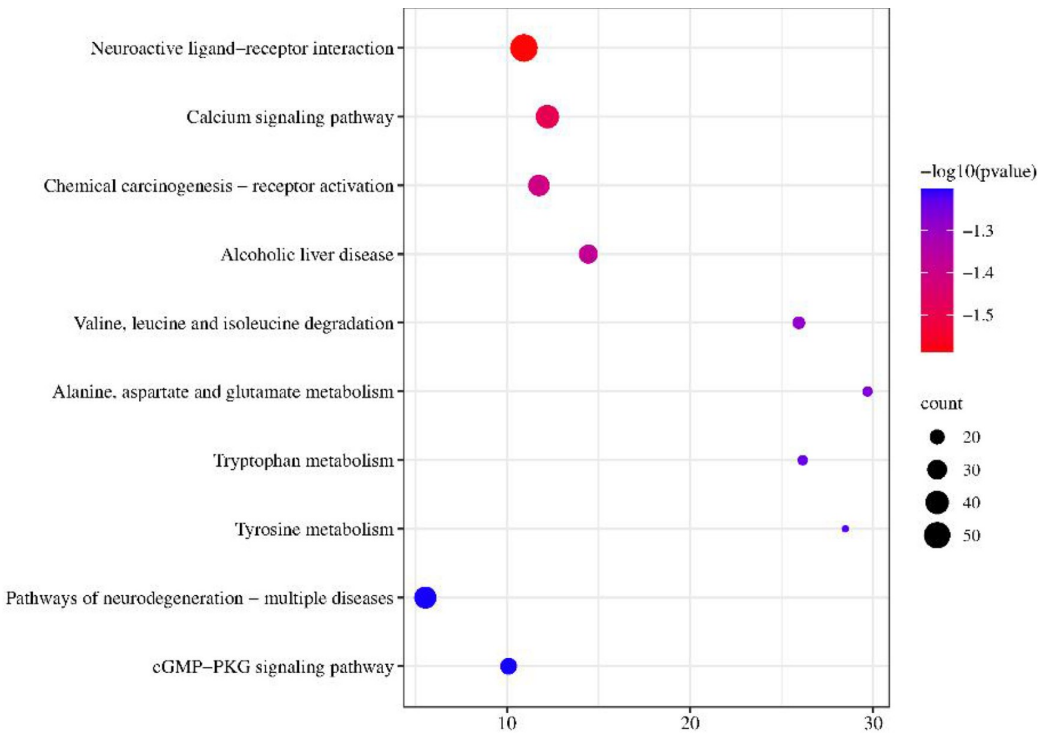

图 5　KEGG 通路富集分析气泡图(前 10 条)

表 2　KEGG 通路富集分析

信号通路	Enrichment	LOG10(P)	Count
Neuroactive ligand-receptor interaction	10.92317	-38.83	54
Calcium signaling pathway	12.20429	-30.68	40
Chemical carcinogenesis - receptor activation	11.74375	-25.54	34
Alcoholic liver disease	14.43888	-23.69	28
Valine,leucine and isoleucine degradation	25.93411	-19.38	17
Alanine,aspartate and glutamate metabolism	29.68611	-18.23	15
Tryptophan metabolism	26.15205	-17.23	15
Tyrosine metabolism	28.47667	-16.74	14
Pathways of neurodegeneration-multiple diseases	5.53808	-15.91	36
cGMP-PKG signaling pathway	10.08498	-15.91	23

3　讨　　论

本研究通过构建“成分-靶点-疾病”网络模型进行拓扑分析,共得到养心定悸膏抗心律失常 degree 值排前 20 位的核心成分,即赖氨酸、γ-氨基丁酸、槲皮素、豆甾醇、β-谷甾醇、尿苷、鸟嘌呤核苷、山柰酚、甲基麦冬酮 B、麦冬二氢高异黄酮 E 等。多归属于麦冬及甘草。郭慧等[14]基于数据挖掘技术发现中医药治疗心律失常的单味药使用频次从高到低依次为甘草、桂枝、麦冬、丹参、五味子等。与本研究结果重合度较高。其中,甘草经过蜜炙后总黄酮含量升高,能提高对抗乌头碱、氯化钡冠脉结扎和氯化钙-碳酸氢铵混合液诱发的心律失常,具有广泛的抗心律失常作用[15-17]。此外,甘草水提液可通过负性频率、负性传导作用发挥抗心律失常作用[18]。麦冬具有抗心肌缺血及心律失常的作用,可对抗心肌损伤引起的心电图 ST 段升高,显著抑制心肌组织中磷酸肌酸激酶(CPK)的释放,降低血清 CPK 水平,保护心肌组织超氧化物歧化酶的活性,减少丙二醛的生成[19]。邹超英等[20]对 57 例冠心病心律失常、心功能不全患者进行观察发现,注射参麦注射液的治疗组能明显改善心律失常表现。由此可知网络药理学研究方法中筛选参数及模型构建较为合理。

通过 PPI 网络拓扑分析,养心定悸膏抗心律失常的核心靶点包括 ALB、AKT1、VEGFA、IL-6 等。研究显示,尿蛋白的升高与心血管疾病发生风险的增加有关,需考虑将 24 h 尿微量白蛋白作为房性心律失常的一个可预防的风险因素[21-22]。AKT1 主要参与 PI3K/AKT 信号通路的调控,抑制心肌细胞凋亡,减轻炎症反应和氧化应激水平,保护大鼠免受缺血/再灌注诱导的心肌损伤[23]。VEGFA 是一种促血管生成因子。韦方等[24]研究发现经冠状静脉窦逆行灌注 VEGF 能显著改善缺血心肌的血流灌注,增加心电稳定性,减少严重心律失常的发生。此外,研究发现通过减少 IL-6 的生成,改善炎症反应可以发挥抗心肌缺血、心律失常的作用[25]。

KEGG 通路分析发现,养心定悸膏抗心律失常与神经活性配体-受体相互作用、钙离子通道、cGMP-PKG 等信号通路相关。心脏离子通道的功能活动发生改变与心律失常有着密切关系。其中,Ca^{2+}调控异常所致的病理性重构可进一步促进心律失常的发生[26-27]。研究报道,中药中生物碱[28]、皂苷[29]和黄酮类化合物[30]等都可调控 Ca^{2+}稳态而抗心律失常,主要表现为钙离子拮抗作用。此外,激活 cGMP/PKG 信号通路可以起到心肌保护及抗心肌缺血再灌注损伤作用[31],其机制可能与增加凋亡蛋白 B 细胞淋巴瘤/白血病-2 蛋白的表达和抑制线粒体膜通透性转换孔的开放有关[32]。

综上所述,本研究以养心定悸膏为研究对象,通过网络药理学方法预测其抗心律失常的潜在作用成分、靶标及通路。阐释了养心定悸膏抗心律失常具有多成分-多靶点-多通路的作用机制,为后续进一步实验设计的优化等提供了重要参考依据。

参考文献

[1]　谢延峥,马金,马世玉,等. 中医药防治心律失常的问题与解决策略[J]. 广州中医药大学学报,2021,38(6):6.

[2]　马丽媛,王增武,樊静,等.《中国心血管健康与疾病报告 2021》要点解读[J]. 中国全科医学,2022,25(27):3331-3346.

[3]　DESHMUKH A,PATEL NJ,PANT S,et al. In-hospital complications associated with catheter ablation of atrial fibrillation in the United States between 2000 and 2010: Analysis of 93 801 procedures[J]. Circulation,2013,128(19):2104-2112.

[4]　黄从新,张澍,黄德嘉,等. 心房颤动:目前的认识和治疗的建议-2018[J]. 中国心脏起搏与心电生理杂志,2018,32(4):315-368.

[5]　郑蕊,陈静,樊官伟,等. 潜在恶性心律失常治疗进展及中医药防治特点与前景[J]. 中医杂志,2015,56(18):1615-1618.

[6]　潘灿. 炙甘草汤辅助西药治疗心悸对心理状态及血清 NT-proBNP 水平的影响[J]. 医学理论与实践,2023,36(1):43-45.

[7]　郭晟. 炙甘草汤对大鼠心房肌细胞离子通道的影响及机制研究[D]. 武汉:湖北中医药大学,2021.

[8] 郑旭颖. 基于 PI3K/Akt/mTOR 信号通路研究炙甘草汤抗大鼠 MIRI 致心律失常的作用机制[D]. 呼和浩特:内蒙古医科大学,2019.

[9] 贾敏,王静,张冀东,等. 养心定悸胶囊调控 NOS 途径改善心肌缺血再灌注损伤及其引起的心律失常[J]. 中国医院药学杂志,2019,39(14):1444-1449.

[10] 韩雪娟,孔祥芳,戴京涛. 养心定悸胶囊治疗帕金森病合并抑郁患者的临床疗效及对 PI3K, AKT, mTOR 蛋白水平的影响[J]. 世界中西医结合杂志,2022,17(7):1346-1350.

[11] 陈海彬,周红光,李文婷,等. 网络药理学——中药复方作用机制研究新视角[J]. 中华中医药杂志,2019,34(7):2873-2876.

[12] TRIPATHI S,POHL MO,ZHOU YY,et al. Meta- and orthogonal integration of influenza "omics" data defines a role for ubr4 in virus budding[J]. Cell Host Microbe,2015,18(6): 723-735.

[13] ZHOU YY,ZOU B,PACHE L,et al. Metascape provides a biologist-oriented resource for the analysis of systems-level datasets[J]. Nat Commun,2019,10(1): 615-621.

[14] 郭慧,范平,郭刚. 基于数据挖掘技术分析中医治疗心律失常用药规律[J]. 中国农村卫生,2021,13(6):32-34.

[15] 谢世荣,杨静娴. 甘草黄酮抗实验性心律失常的作用[J]. 基础医学与临床,1998,18(2):72-74.

[16] 杨继媛,吴红金. 甘草次酸抗实验性心律失常及机制的研究[J]. 中西医结合心脑血管病杂志,2010,8(10):1229-1231.

[17] 蒋森,刘德明,陈薇,等. 甘草次酸对乌头碱致大鼠心律失常的拮抗作用[J]. 中药药理与临床,2021,37(4):132-137.

[18] 黄彩云,谢世荣,杨静娴,等. 甘草水提液抗实验性心律失常的作用[J]. 大连医科大学学报,2003,25(1):13-15.

[19] 高广猷,宋晓亮,叶丽虹. 山麦冬总氨基酸对大鼠实验性心肌缺血的保护作用[J]. 中国药理学通报,1993,9(4):281-284.

[20] 邹超英,朱燕文,张聘. 参麦注射液治疗冠状动脉粥样硬化性心脏病心律失常疗效观察[J]. 中国中西医结合急救杂志,1999,6(12):572.

[21] WACHTELL K,IBSEN H,OLSEN MH,et al. Albuminuria and cardiovascular risk in hypertensivepatients with left ventricular hypertrophy:The LIFE study[J]. Ann Intern Med,2003,139(11):901-906.

[22] 那德热木·帕尔曼江,张俊仕,刘海明,等. 原发性高血压患者 24 h 尿微量白蛋白与房性心律失常的相关性[J]. 中华高血压杂志,2021,29(9):855-859.

[23] 朱舜明,张荣怀,张学军,等. 阿魏酸通过磷酸肌醇 3 激酶/丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶途径保护大鼠免受心肌缺血/再灌注损伤[J]. 安徽医药,2022,26(11):2203-2208.

[24] 韦方,袁明兰,王树辉. 冠状静脉窦逆行灌注 VEGF 蛋白对兔心肌梗死模型心电图演变及心律失常的影响[J]. 实用心电学杂志,2008,17(4):263-264.

[25] 戴建初. 炙甘草汤加减治疗对冠心病心律失常患者心功能及 TNF-α、IL-6、hs-CRP 的影响[J]. 现代医学与健康研究电子杂志,2020,4(12):61-63.

[26] LANDSTROM AP,DOBREV D,WEHRENS XHT. Calcium signaling and cardiac arrhythmias[J]. Circ Res,2017,120(12):1969-1993.

[27] DAL CORTIVO G,BARRACCHIA CG,MARIN V,et al. Alterations in calmodulin-cardiac ryanodine receptor molecular recognition in congenital arrhythmias[J]. Cell Mol Life Sci,2022,79(2):127.

[28] 蒋桔泉,曾秋棠,曹林生,等. 粉防己碱抗氯化铯诱发家兔在体心脏早期后除极化及心律失常的作用[J]. 中国药物与临床,2002,2(3):163-165.

[29] BAI CX,TAKAHASHI K,MASUMIYA H,et al. Nitric oxide-dependent modulation of the delayed rectifier K^+ current and the L-type Ca^{2+} current by ginsenoside Re,an ingredient of Panax ginseng,in guinea-pig cardiomyocytes[J]. Br J Pharmacol,2004,142(3):567-575.

[30] 蒋晚珍. 淫羊藿苷,一种抑制心律失常的钠钙通道阻断剂[D]. 武汉:武汉科技大学,2017.

[31] 潘国焰. cGMP/PKG 信号通路在心肌缺血/再灌注损伤的作用机制研究[D]. 福州:福建医科大学,2013.

[32] RAZAVI HM,HAMILTON JA,FENG Q. Modulation of apoptosis by nitric oxide: Implications in myocardial ischemia and heart failure[J]. Pharmacol Ther,2005,106(2):147-162.

(收稿日期:2023-04-17)

[编辑:刘珍]