

基于网络药理学和分子对接探讨黄芪治疗病毒性心肌炎的作用机制

李中豪^{1,2}, 顾凯元^{1,3}, 任晋宏^{1*}

¹山西中医药大学, 晋中 030619; ²南京中医药大学, 南京 210023; ³沈阳药科大学, 沈阳 110016

摘要:本文基于网络药理学方法探讨黄芪治疗病毒性心肌炎的潜在作用机制。通过 TCMSp 数据库和疾病数据库, 分别检索并筛选得到黄芪治疗病毒性心肌炎的潜在作用靶点, 利用 Cytoscape 3.7.1 构建“黄芪活性成分-病毒性心肌炎-靶点”网络、蛋白互作网络, 然后利用 R 语言进行 GO 功能和 KEGG 通路富集分析, 并通过 Sybyl-X 2.0 对重要黄芪活性成分和靶点进行分子对接。结果表明, 黄芪活性成分 22 个, 关键靶点 97 个, 共涉及 1 327 个生物学过程, 29 个细胞组分, 66 个分子功能及 90 条信号通路。分子对接结果显示异微凸剑叶莎醇与 TP53 结合最好。本研究初步探讨了黄芪治疗病毒性心肌炎的潜在作用靶点及重要信号通路, 为后续提供了新的思路。

关键词:黄芪; 病毒性心肌炎; 网络药理学; 分子对接

中图分类号: R285

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2022)7-1223-12

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2022.7.016

Study on the mechanism of Astragali Radix in the treatment of viral myocarditis based on network pharmacology and molecular docking

LI Zhong-hao^{1,2}, GU Kai-yuan^{1,3}, REN Jin-hong^{1*}

¹Shanxi University of Chinese Medicine, Jinhong 030619, China; ²Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China;

³Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China

Abstract: This paper explores the potential mechanism of Astragali Radix in the treatment of viral myocarditis by network pharmacology. Through TCMSp database and disease database, the potential targets of Astragali Radix in the treatment of viral myocarditis were retrieved and screened, respectively, and Cytoscape 3.7.1 was used to construct the “Astragali Radix active ingredient-viral myocarditis-target” network and protein interaction network, followed by GO function and KEGG pathway enrichment analysis using R language, and molecular docking of important Astragali Radix active components and targets by Sybyl-X 2.0. The results showed that there were 22 active components and 97 key targets of Astragali Radix, involving a total of 1 327 biological processes, 29 cellular components, 66 molecular functions and 90 signaling pathways. Molecular docking results showed that (3R)-3-(2-hydroxy-3,4-dimethoxyphenyl)chroman-7-ol had the best binding to TP53. This study initially explored the potential targets and important signaling pathways of Astragali Radix for the treatment of viral myocarditis, which provided new ideas for further research.

Key words: Astragali Radix; viral myocarditis; network pharmacology; molecular docking

病毒性心肌炎(viral myocarditis, VMC)是因病毒对心肌直接造成损伤或因自身免疫炎症性反应而诱发心肌局灶性或弥漫性的炎性病变,其临床主要表

现为患者发病前多出现肠道或上呼吸道感染症状,轻症患者无任何症状,而重者则出现休克、猝死等症^[1]。VMC的发病率大约为每10万人中10至22人^[2]。但迄今尚无具体的临床治疗特效药物,抗病毒和营养心肌药物主要用于有效控制患者的病情。

结合 VMC 临床表现,中医学认为,VMC 应归属于“温病”“胸痹”“心悸”等范畴^[3]。其病因为人之正气亏虚,而外感温热邪毒;病机为因热毒内侵,致

收稿日期:2021-09-15 接受日期:2022-04-13

基金项目:国家国际合作专项(2013DFA30700);国家自然科学基金(81703959);山西省应用基础研究项目(20180D221437);山西中医药大学科技创新能力培育计划(2019PY-138)

*通信作者 Tel:86-351-3179717;E-mail:Jhren@sxtcm.edu.cn

人气阴耗伤,致瘀血阻络、心失所养,患者多出现虚、滞、瘀等表现^[4],治疗上讲究分期辨证与分型辩证相结合,应强调益气养阴、活血化瘀。近年来,众多研究证明黄芪在治疗 VMC 方面疗效甚佳,临床常单用黄芪注射液或联合其他药物共同治疗 VMC^[5,6],已于临床推广。

传统中药黄芪含黄芪多糖、黄芪甲苷、黄芪黄酮、槲皮素、山奈酚等多种活性成分。现代医学研究表明,黄芪及其活性成分单体(如黄芪甲苷、黄芪黄酮、黄芪多糖等)治疗病毒性心肌炎的潜在机制较多,包括氧化应激作用、免疫调节作用、抑制炎症反应、调节细胞凋亡等方面^[7],然而详细作用机制尚不明确。

网络药理学作为一门新兴研究学科,首次由英国药理学家 Hopkins 提出概念^[8],近年来发展迅速。它凭借系统生物学理论基础,对药物活性成分及其潜在作用靶点和信号通路进行预测,以期提高药效研究或临床试验的准确性^[9]。因此,本研究基于网络药理学和分子对接技术预测黄芪治疗病毒性心肌炎的活性成分及相关靶标和通路,以期阐明其生物过程及作用机制。

1 材料与方法

1.1 筛选黄芪活性成分

本研究通过 TCMSp 数据库(<http://tcmspw.com/tcmsp.php>),筛选黄芪活性成分信息。其中筛选条件为“口服生物利用度(oral bioavailability, OB) $\geq 30\%$ 且类药性(drug-likeness, DL) ≥ 0.18 ”,获得 20 个活性成分。此外,查阅相关文献^[10],整理活性成分单体纳入讨论。

1.2 收集黄芪活性成分潜在靶点

本研究将黄芪潜在靶点分为已验证靶点和预测所得靶点两部分。

活性成分已验证靶点是通过 Pubchem 数据库(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)中生物测定结果(BioAssay results)得到数据,然后限定“Active”和“Human”来筛选已验证靶点。最后利用 Uniprot 数据库(<https://www.uniprot.org/>)将备选药物靶点转换成基因名称。

预测靶点是首先查询 Pubchem 数据库中黄芪活性成分的 SMILES,将其输入 SwissTargetPrediction(<http://www.swisstargetprediction.ch/>)中,依据化学相似性寻找靶点。并通过 Uniprot 数据库将靶点规范化基因名称,并剔除非人类或未验证 UniprotID

的基因。

最后汇总两部分靶点,删去重复靶点信息,获得黄芪活性成分靶点库。

1.3 构建“黄芪活性成分-靶点”网络

将上述获得的活性成分及靶点建立相应的数据表,并将其作为输入文件导入 Cytoscape 3.7.1 软件中,以完成“黄芪活性成分-靶点”网络的构建,对黄芪活性成分及靶点进行可视化分析。

1.4 收集病毒性心肌炎疾病靶点及黄芪作用靶点

分别通过 GeneCards 数据库(<https://www.genecards.org/>)、OMIM 数据库(<https://omim.org/>)及 DisGeNET 数据库(<https://www.disgenet.org/>)以“viral myocarditis”为关键词检索与 VMC 相关的基因,去重后获得 VMC 相关基因。将挖掘到的 VMC 相关基因与黄芪活性成分的靶点基因映射筛选以获取交集靶点,即黄芪活性成分治疗 VMC 的潜在作用靶点,并绘制 Venn 图。

1.5 构建“黄芪活性成分-VMC-靶点”网络

依据所得数据,建立网络文件和属性文件,并导入 Cytoscape 3.7.1 软件中,以构建“黄芪活性成分-VMC-靶点”网络。接着利用 network analyzer 等插件进行网络特征分析,来突出黄芪中较重要的活性成分及潜在靶点。

1.6 构建黄芪-VMC 靶点蛋白相互作用网络和归属作用靶点类型

将交集靶点输入 String 在线软件(<https://string-db.org/>),其中筛选条件限定物种为人,最低互作分数为 0.4,保存数据结果。其次将数据结果文件导入 Cytoscape 3.7.1 软件中构建蛋白互作(PPI)图,计算出 degree 值以调整靶点大小及颜色,区分靶点重要程度。接着借助 DisGeNET 数据库对 degree 值较大的作用靶点进行检索,获取靶点类型信息,来推测重要靶点在治疗过程中可能发挥的作用。

1.7 GO 功能分析与 KEGG 通路富集

将黄芪-VMC 交接靶点使用 R 语言进行基因本体(GO)富集分析和 KEGG 通路分析,设置 $P < 0.01$ 为筛选标准,整理结果按照 P value 大小排序,并绘 GO 功能分析、KEGG 通路富集信息柱状图及气泡图。整理分析结果数据,筛选富集程度较高的前 20 条通路,利用 Cytoscape 3.7.1 软件构建“靶点-KEGG 通路”网络。

1.8 分子对接

为检验黄芪关键活性成分及重要靶点的结合方式和契合度,本研究选择连接靶点数目最多的前 8 种活性成分和 5 个关键作用靶点依次进行分子对接验证。首先从 TCMSp 数据库中下载活性成分的 mol2 格式文件,利用 Sybylx-2.0 软件进行能量优化,获得修正后的小分子 mol2 格式文件。随后从 RSCB PDB 数据库中 (<http://www.rcsb.org/>) 中筛选 5 个重要靶点蛋白较合适的蛋白结构,并下载其 PDB 格式文件。接着将蛋白结构导入 Sybylx-2.0 中

进行预处理,包括修正蛋白、提取配体结构、删除水分子、为蛋白加氢等。最后,利用 Sybylx-2.0 中的 Surflex-Dock 功能依次将小分子与蛋白进行分子对接,利用 Total Score 评价对接结果。

2 结果

2.1 黄芪活性成分的筛选

通过 TCMSp 数据库检索“黄芪”,获得符合条件的 20 种活性成分;检索文献获得对 VMC 有明显治疗效果的成分:黄芪甲苷和黄芪三萜皂苷。因此,共获得 22 种黄芪活性成分,结果见表 1。

表 1 黄芪活性成分信息
Table 1 Astragali Radix active ingredient information

编号 ID	TCMSp 编号 TCMSp No.	成分名称 Ingredient name	口服生物 利用度 OB(%)	类药性 DL
HQ1	MOL000033	β -谷甾醇 β -Sitosterol	36.23	0.78
HQ2	MOL000098	槲皮素 Quercetin	46.43	0.28
HQ3	MOL000211	白桦脂酸 Mairin	55.38	0.78
HQ4	MOL000239	华良姜素 Jaranol	50.83	0.29
HQ5	MOL000296	常春藤皂苷元 Hederagenin	36.91	0.75
HQ6	MOL000354	异鼠李素 Isorhamnetin	49.60	0.31
HQ7	MOL000371	3,9-二-O-甲基尼森香豌豆紫檀酚 3,9-Di-O-methylnisosin	53.74	0.48
HQ8	MOL000374	5'-羟基异微凸剑叶莎醇-2',5'-二-O-葡萄糖苷 5'-Hydroxyiso-muronulatol-2',5'-di-O-glucoside	41.72	0.69
HQ9	MOL000378	7-O-甲基-异微凸剑叶莎醇 7-O-Methylisomucronulatol	74.69	0.30
HQ10	MOL000379	9,10-二甲氧基紫檀烷-3-O- β -D-葡萄糖苷 9,10-Dimethoxypterocarpan-3-O- β -D-glucoside	36.74	0.92
HQ11	MOL000380	美迪紫檀素 (6aR,11aR)-9,10-Dimethoxy-6a,11a-dihydro-6H-benzofurano[3,2-c]chromen-3-ol	64.26	0.42
HQ12	MOL000387	联苯双酯 Bifendate	31.10	0.67
HQ13	MOL000392	刺芒柄花素 Formononetin	69.67	0.21
HQ14	MOL000398	异黄酮 Isoflavanone	109.99	0.30
HQ15	MOL000417	毛蕊异黄酮苷 Calycosin	47.75	0.24
HQ16	MOL000422	山奈酚 Kaempferol	41.88	0.24
HQ17	MOL000433	叶酸 Folic acid	68.96	0.71
HQ18	MOL000438	(3R)-3-(2-羟基-3,4-二甲氧基苯基)铬-7-醇 (3R)-3-(2-Hydroxy-3,4-dimethoxyphenyl)chroman-7-ol	67.67	0.26
HQ19	MOL000439	异微凸剑叶莎醇-7,2'-二-O-葡萄糖甙 Isomucronulatol-7,2'-di-O-glucoside	49.28	0.62
HQ20	MOL000442	1,7-二羟基-3,9-二甲氧基紫檀烯 1,7-Dihydroxy-3,9-dimethoxy pterocarpene	39.05	0.48
HQ21	-	黄芪三萜皂苷 Astragalus saponins	-	-
HQ22	MOL000407	黄芪甲苷 Astragaloside IV	22.5	0.15

2.2 黄芪活性成分潜在靶点的收集

通过上述数据库获得已验证靶点 200 个,预测所得靶点 418 个,汇总去重后共获得黄芪活性成分潜在靶点 505 个。

2.3 “黄芪活性成分-靶点”网络的构建

利用 Cytoscape 3.7.1 对黄芪活性成分和潜在

作用靶点的关系网络进行绘制和分析,如图 1 所示,构建的网络共获得 528 个节点和 1 392 个关系,图中橙色方块代表潜在靶点,黄色菱形代表黄芪活性成分。

2.4 疾病靶点及药物作用靶点的筛选

通过 GeneCards 数据库获得 847 个靶点,OMIM

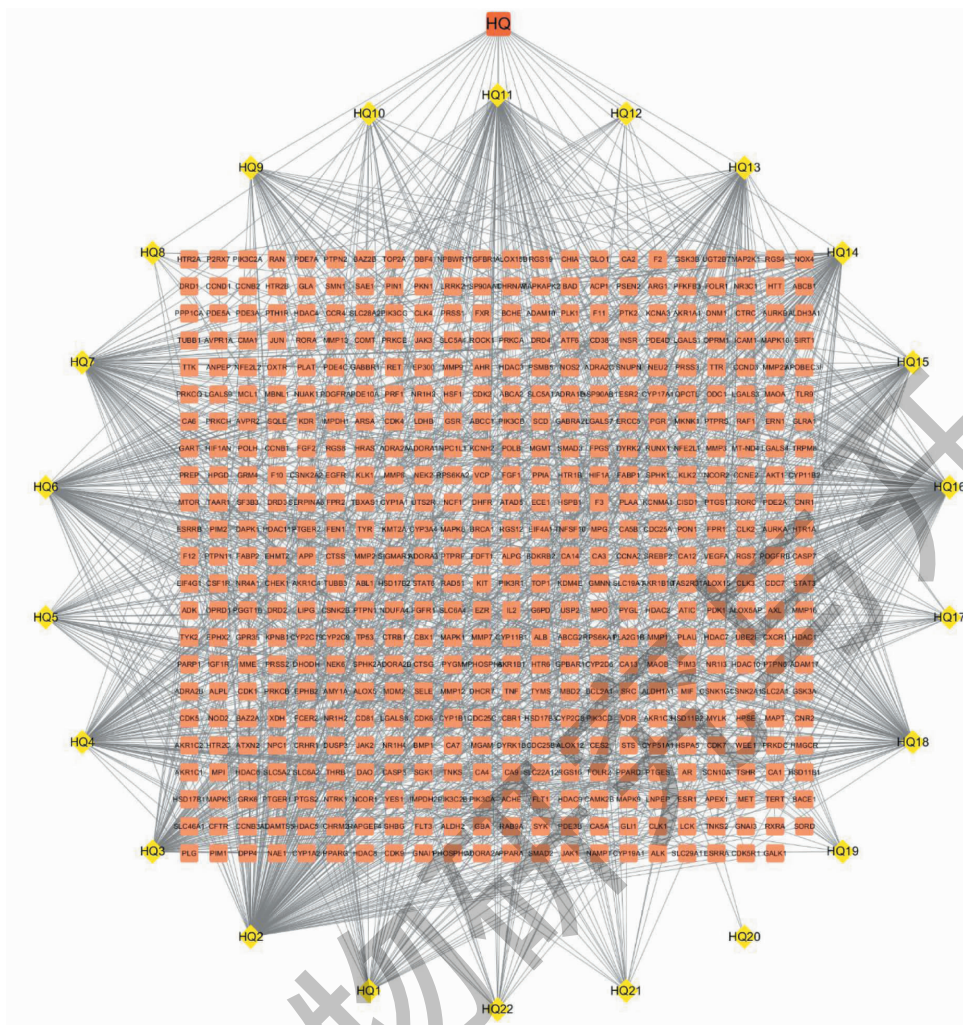


图1 “黄芪活性成分-靶点”网络

Fig.1 “Astragali Radix active ingredient-target” network

数据库获得 248 个靶点, GeneCards 数据库获得 129 个靶点, 去除重复靶点, 最终获得 1 116 个 VMC 疾病相关靶点。

将黄芪潜在靶点与 VMC 疾病相关靶点取交集, 共收集到 97 个共同靶点(见图 2)。

2.5 “黄芪-VMC-靶点”网络的构建

使用 Cytoscape 3. 7. 1 软件构建的“黄芪-VMC-靶点”网络如图 3 所示, 共获得 120 个节点和 397 个关系。图中六边形代表病毒性心肌炎, 圆形代表黄芪活性成分, 八边形代表这些活性成分治疗 VMC 的

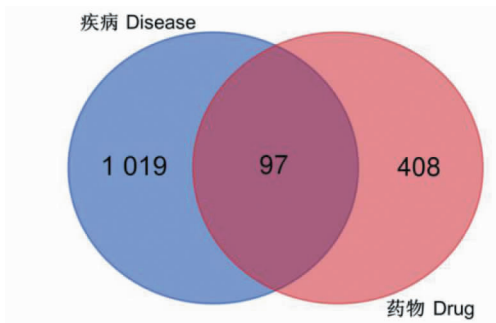


图2 疾病与药物交集靶点韦恩图

Fig.2 Venn diagram of the intersection of disease and drug target

相关作用靶点。图形填充的颜色越深,表示这个成分或者靶点相连的边越多,即节点的 degree 越高。其中槲皮素相连 34 个靶点,3,9-二-*O*-甲基尼森香豌豆紫檀酚相连 25 个靶点,山奈酚相连 23 个靶点,(3*R*)-3-(2-羟基-3,4-二甲氧基苯基)铬-7-醇相连 22

个靶点,华良姜素相连 22 个靶点,美迪紫檀素相连 19 个靶点,白桦脂酸相连 17 个靶点,异鼠李素相连 13 个靶点。这提示黄芪在治疗 VMC 方面上述成分会起到关键作用。

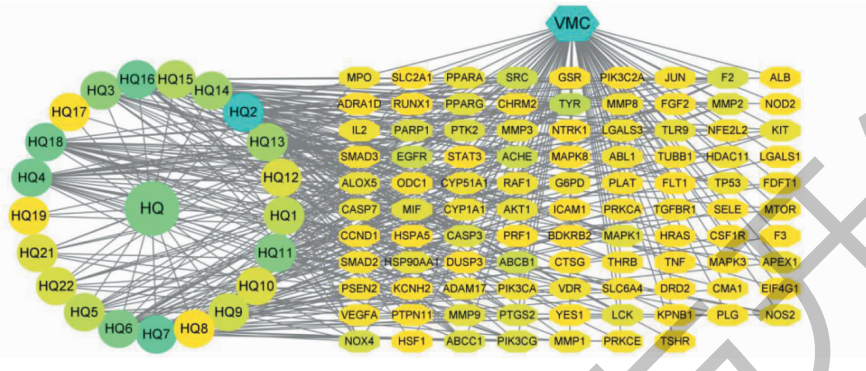


图 3 “黄芪活性成分-VMC-靶点”网络

Fig. 3 “Astragali Radix active ingredient-VMC-target” network

2.6 PPI 图的构建

图 4 展示了根据黄芪潜在作用的 97 个靶点绘制所得的 PPI 网络,共有 96 个靶点蛋白节点(有一个靶点游离,与其他蛋白无相互作用),共有 1 271 条边。其中颜色较深的靶点蛋白有 ALB、TP53、AKT1、MAPK3、VEGFA、CASP3、EGFR 等,表明相连的其他靶点数目较多。通过 Cytoscape 3.7.1 软件的网络分析工具,将 degree 值 ≥ 50 的重要靶点依次导入 DisGeNET 数据库,获取靶点对应的类型,详细信息见表 2。

2.7 基因功能及通路分析

利用 R 语言对 97 个靶点进行 GO 分析和 KEGG 通路分析,设定阈值 $P < 0.01$ 。GO 富集分析包括 3 个分支,分别是细胞组分 (cellular component, CC)、分子功能 (molecular function, MF) 和生物过程 (biological process, BP) 对基因产物进行相关注释。

CC 分析中可知,相关靶点主要涉及膜 (membrane)、转录因子复合物 (transcription factor complex)、细胞质囊泡腔 (cytoplasmic vesicle lumen)、细胞-底物连接 (cell-substrate junction) 以及免疫突触

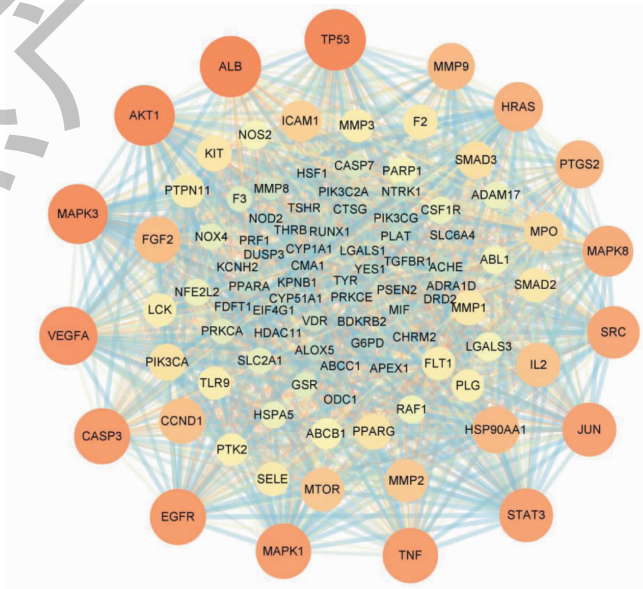


图 4 蛋白互作 (PPI) 网络

Fig. 4 Protein-protein interaction (PPI) network

表 2 黄芪治疗 VMC 关键作用靶点及其相关性质

Table 2 Key targets of Astragali Radix in the treatment of VMC and their related properties

基因 Gene	蛋白 Protein	蛋白类型 Protein type	度 Degree	介数中心性 Betweenness centrality	中心接近度 Closeness centrality
ALB	Serum albumin	Transporter	68	0.063 397 66	0.778 688 52
TP53	Cellular tumor antigen p53	Transcription factor	68	0.055 013 94	0.772 357 72
AKT1	AKT serine/threonine kinase 1	Kinase	67	0.048 639 46	0.772 357 72
MAPK3	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 3	Kinase	66	0.049 207 22	0.766 129 03
VEGFA	Vascular endothelial growth factor A	Signaling	64	0.0291 245 2	0.748 031 5
CASP3	Caspase-3	Enzyme	61	0.039 488 69	0.730 769 23
EGFR	Epidermal growth factor receptor	Kinase	61	0.046 746 73	0.730 769 23
TNF	Tumor necrosis factor	Signaling	60	0.025 561 52	0.730 769 23
MAPK1	Mitogen-activated protein kinase 1	Kinase	60	0.032 889 87	0.730 769 23
STAT3	Signal transducer and activator of transcription 3	Nucleic acid binding	58	0.029 230 45	0.714 285 71
JUN	Proto-oncogene c-JUN	Transcription factor	58	0.020 644 01	0.714 285 71
SRC	SRC proto-oncogene, non-receptor tyrosine kinase	Kinase	56	0.027 025 31	0.703 703 7
MAPK8	Mitogen-activated protein kinase 8	Kinase	54	0.016 283 14	0.688 405 8
HRAS	HRas proto-oncogene, GTPase	Enzyme modulator	52	0.016 682 61	0.68345324
PTGS2	Prostaglandin-endoperoxide synthase 2	Enzyme	50	0.016 038 14	0.67857143

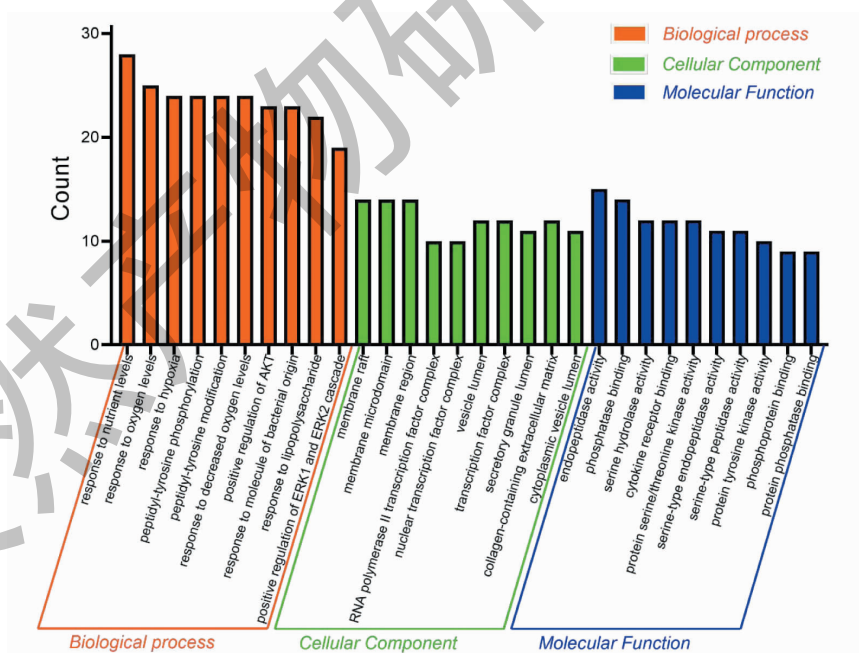


图 5 黄芪活性成分潜在治疗 VMC 靶点的 GO 分析图

Fig. 5 GO analysis of Astragali Radix active ingredients for potential treatment of VMC targets

(immunological synapse) 等。MF 分析中, 这些靶点很大程度上与磷酸酶结合 (phosphatase binding)、细胞因子受体结合 (cytokine receptor binding)、丝氨酸

水解酶活性 (serine hydrolase activity)、蛋白质酪氨酸激酶活性 (protein tyrosine kinase activity) 及转录因子的活性 (transcription factor activity) 等功能有

关。BP 分析,上述靶点大多涉及对营养水平和氧气水平的反应(response to nutrient and oxygen levels)、对肽基酪氨酸的修饰调控(modification and regulation of peptide tyrosine)、ERK1 和 ERK2 级联的调控(regulation of ERK1 and ERK2 cascade)、细胞对氧化应激的反应(response to oxidative stress)。取排名前 10 的通路建立柱状图,如图 5 所示。

排名前 20 的 KEGG 通路富集信息气泡图(见图 6)结果显示,黄芪治疗 VMC 的主要靶点主要涉及 PI3K-Akt 信号通路(22 个靶点/24%)、TNF 信号通路(15 个靶点/16%)、细胞凋亡通路(15 个靶点/16%)及 Th17 细胞分化(13 个靶点/14%)等信号通路。

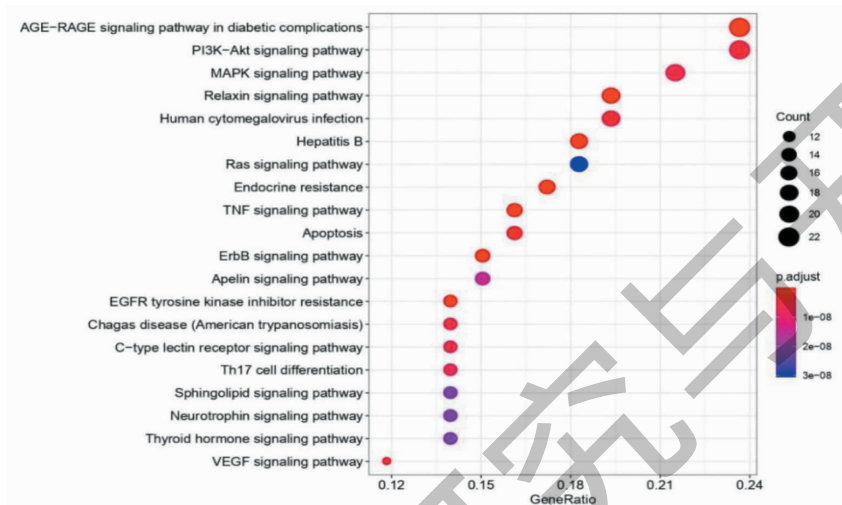


图 6 黄芪治疗 VMC 关键靶点参与的通路富集信息气泡图

Fig. 6 Bubble map of pathway enrichment information involved in key targets of Astragali Radix in the treatment of VMC

依据 KEGG 通路分析数据结果,绘制出“靶点-KEGG 通路”网络(见图 7),共得到 78 个节点和 310 个关系。图中菱形代表关键作用靶点,六边形代表 KEGG 富集前 20 的通路。根据图形的透明度代表这个靶点或通路的富集程度。由图 7 可观察到,

TP53(肿瘤蛋白 p53)、AKT1 (AKT 丝氨酸/苏氨酸激酶 1)、EGFR(表皮生长因子受体)、CASP3(半胱天冬酶 3)、VEGFA(血管内皮生长因子 A)等靶点及 PI3K-Akt 信号通路、TNF 信号通路等通路富集程度较高。

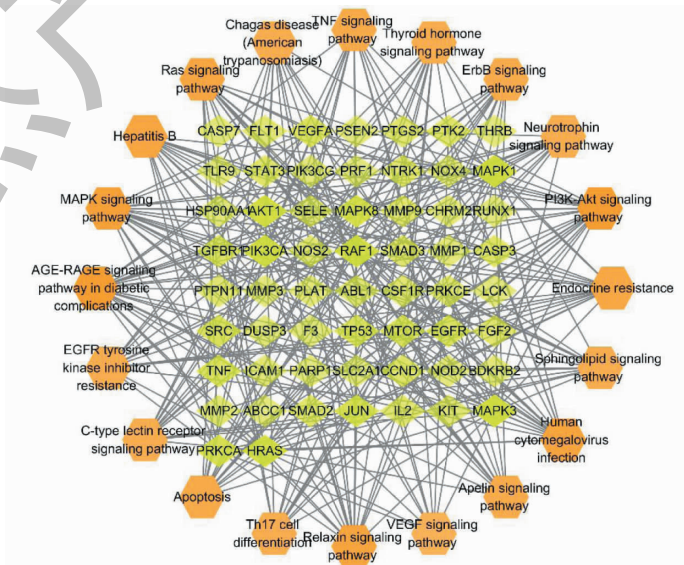


图 7 “靶点-KEGG 通路”网络

Fig. 7 “Target-KEGG pathway” network

2.8 分子对接结果

Dock 系统对接 Total score > 4.25 时,表明分子与靶点之间存在结合活性,Total score > 5.0 证明结合活性较高,Total score > 7.0 说明两者存在强烈的结合活性^[11]。本研究选择连接靶点数目最多的前 8 种活性成分(包括槲皮素、3,9-二-*O*-甲基尼森香豌豆紫檀酚、山奈酚、华良姜素、(3*R*)-3-(2-羟基-3,4-

二甲氧基苯基)铬-7-醇、异鼠李素、美迪紫檀素和白桦脂酸)和 5 个关键作用靶点(TP53、AKT1、EGFR、CASP3 和 VEGFA)依次进行分子对接验证,对接参数详见表 3。结果以热图的形式呈现(见图 8),其中数值代表分子对接作用的分值,数值越大表示黄芪中的活性成分与靶点蛋白的分子对接亲和作用越强。

表 3 黄芪活性成分与靶点分子对接结果

Table 3 Docking results of active components of Astragali Radix and target molecules

成分名称 Ingredients name	靶点 Target	总分 Total score	碰撞系数 Coefficient of restitution	极性 Polarity
槲皮素 Quercetin	AKT1	6.141 3	-1.753 5	4.199 3
白桦脂酸 Mairin	AKT1	7.769 4	-2.973 2	-1.068 2
华良姜素 Jaranol	AKT1	6.994 7	-1.712 5	3.006 5
异鼠李素 Isorhamnetin	AKT1	4.754 2	-1.258 7	4.532
3,9-二- <i>O</i> -甲基尼森香豌豆紫檀酚 3,9-Di- <i>O</i> -methylnissolin	AKT1	4.758 7	-1.261 5	0.781 5
美迪紫檀素 (6 <i>aR</i> ,11 <i>aR</i>)-9,10-Dimethoxy-6 <i>a</i> , 11 <i>a</i> -dihydro-6 <i>H</i> -benzofurano[3,2- <i>c</i>]chromen-3-ol	AKT1	5.971 7	-0.222 3	3.081 8
山奈酚 Kaempferol	AKT1	5.604 3	-1.375 5	3.770 2
(3 <i>R</i>)-3-(2-羟基-3,4-二甲氧基苯基)铬-7-醇 (3 <i>R</i>)-3-(2-Hydroxy-3,4-dimethoxyphenyl)chroman-7-ol	AKT1	7.047 5	-1.466 0	5.975 7
槲皮素 Quercetin	EGFR	6.778 2	-0.640 9	6.570 2
白桦脂酸 Mairin	EGFR	1.931 9	-2.006 4	0.536 5
华良姜素 Jaranol	EGFR	5.765 7	-0.677 2	2.000 2
异鼠李素 Isorhamnetin	EGFR	5.726 6	-0.644 8	3.316 2
3,9-二- <i>O</i> -甲基尼森香豌豆紫檀酚 3,9-Di- <i>O</i> -methylnissolin	EGFR	6.217 1	-0.813 7	2.099 6
美迪紫檀素 (6 <i>aR</i> ,11 <i>aR</i>)-9,10-Dimethoxy-6 <i>a</i> ,11 <i>a</i> - dihydro-6 <i>H</i> -benzofurano[3,2- <i>c</i>]chromen-3-ol	EGFR	5.489 7	-0.360 3	3.104 2
山奈酚 Kaempferol	EGFR	5.154 1	-0.957 3	4.154 7
(3 <i>R</i>)-3-(2-羟基-3,4-二甲氧基苯基)铬-7-醇 (3 <i>R</i>)-3-(2-Hydroxy-3,4-dimethoxyphenyl)chroman-7-ol	EGFR	7.517 3	-1.152 1	3.890 9
槲皮素 Quercetin	CASP3	2.414 3	-0.487 6	1.118 7
白桦脂酸 Mairin	CASP3	4.352 9	-0.845 2	2.206 6
华良姜素 Jaranol	CASP3	4.344 7	-0.735 2	3.240 6
异鼠李素 Isorhamnetin	CASP3	4.591 4	-0.578 4	2.101 7
3,9-二- <i>O</i> -甲基尼森香豌豆紫檀酚 3,9-Di- <i>O</i> -methylnissolin	CASP3	4.919 8	-0.363 7	1.850 4
美迪紫檀素 (6 <i>aR</i> ,11 <i>aR</i>)-9,10-Dimethoxy-6 <i>a</i> ,11 <i>a</i> - dihydro-6 <i>H</i> -benzofurano[3,2- <i>c</i>]chromen-3-ol	CASP3	4.131 2	-0.613 9	2.820 7
山奈酚 Kaempferol	CASP3	6.190 3	-0.631 4	5.375
(3 <i>R</i>)-3-(2-羟基-3,4-二甲氧基苯基)铬-7-醇 (3 <i>R</i>)-3-(2-Hydroxy-3,4-dimethoxyphenyl)chroman-7-ol	CASP3	5.625 5	-0.514 8	2.402 2
槲皮素 Quercetin	VEGF	3.531 0	-0.583 2	2.994 1
白桦脂酸 Mairin	VEGF	2.929 8	-0.879 2	2.205 3

续表 3 (Continued Tab. 3)

成分名称 Ingredients name	靶点 Target	总分 Total score	碰撞系数 Coefficient of restitution	极性 Polarity
华良姜素 Jaranol	VEGF	2.498 8	-1.194 3	0.003 2
异鼠李素 Isorhamnetin	VEGF	3.487 3	-0.681 0	1.930 1
3,9-二-O-甲基尼森香豌豆紫檀酚 3,9-Di-O-methylnissolin	VEGF	2.805 3	-0.384 5	0.979 1
美迪紫檀素 (6aR,11aR)-9,10-Dimethoxy-6a,11a-dihydro-6H-benzofurano[3,2-c]chromen-3-ol	VEGF	3.177 1	-0.709 8	0.554 8
山奈酚 Kaempferol	VEGF	4.695 8	-0.819 1	2.014 9
(3R)-3-(2-羟基-3,4-二甲氧基苯基)铬-7-醇 (3R)-3-(2-Hydroxy-3,4-dimethoxyphenyl)chroman-7-ol	VEGF	4.261 9	-0.944 0	3.585 9
槲皮素 Quercetin	TP53	6.715 4	-1.207 9	5.410 2
白桦脂酸 Mairin	TP53	3.111 0	-0.904 7	1.800 9
华良姜素 Jaranol	TP53	4.905 3	-0.362 6	3.272 8
异鼠李素 Isorhamnetin	TP53	5.894 2	-0.641 4	6.094 6
3,9-二-O-甲基尼森香豌豆紫檀酚 3,9-Di-O-methylnissolin	TP53	5.295 9	-1.138 5	1.173 7
美迪紫檀素 (6aR,11aR)-9,10-Dimethoxy-6a,11a-dihydro-6H-benzofurano[3,2-c]chromen-3-ol	TP53	5.752 9	-0.991 2	2.559 3
山奈酚 Kaempferol	TP53	5.657 9	-1.124 8	4.163 2
(3R)-3-(2-羟基-3,4-二甲氧基苯基)铬-7-醇 (3R)-3-(2-Hydroxy-3,4-dimethoxyphenyl)chroman-7-ol	TP53	8.057 4	-1.111 9	5.911 7

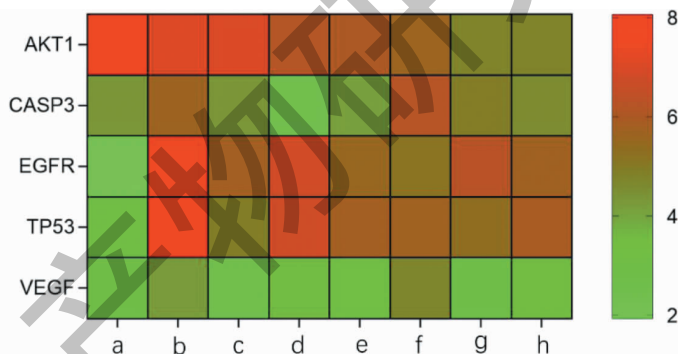


图 8 黄芪活性成分与靶点分子对接结果

Fig. 8 Docking results of active components of Astragali Radix and target molecules

注:a:白桦脂酸;b:(3R)-3-(2-羟基-3,4-二甲氧基苯基)铬-7-醇;c:华良姜素;d:槲皮素;e:美迪紫檀素;f:山奈酚;g:3,9-二-O-甲基尼森香豌豆紫檀酚;h:异鼠李素。Note:a:Mairin;b:(3R)-3-(2-Hydroxy-3,4-dimethoxyphenyl)chroman-7-ol;c:Jaranol;d:Quercetin;e:(6aR,11aR)-9,10-Dimethoxy-6a,11a-dihydro-6H-benzofurano[3,2-c]chromen-3-ol;f:Kaempferol;g:3,9-Di-O-methylnissolin;h:Isorhamnetin.

由上述图表可知,TP53 与 (3R)-3-(2-羟基-3,4-二甲氧基苯基)铬-7-醇(8.057 4)、AKT1 与白桦脂酸(7.769 4)、EGFR 与 (3R)-3-(2-羟基-3,4-二甲氧基苯基)铬-7-醇(7.517 3)、CASP3 与山奈酚(6.190 3)结合情况较好。以上分子对接模式见图 9,配体与受体结合构象模式越稳定,提示黄芪活性成分在治疗 VMC 发挥作用的可能性越大。

3 讨论与结论

黄芪作为传统补气药,有着补脾益气、脱毒生肌

等功效。而黄芪的不同主要活性成分在治疗病毒性心肌炎上影响不同,各有优势。本研究中,将黄芪的 22 个活性成分纳入讨论,共获得 505 个药物靶点,与 VMC 相关的靶点 1 116 个。其中槲皮素、3,9-二-O-甲基尼森香豌豆紫檀酚、山奈酚、(3R)-3-(2-羟基-3,4-二甲氧基苯基)铬-7-醇、华良姜素等相连靶点数目较多,在治疗 VMC 方面会起到关键作用。已有研究证明,槲皮素是通过激活 PI3K/Akt 通路,来减轻 CVB3 诱导的心肌细胞损伤的^[12]。此外,槲皮

素还能抑制炎症反应,具体表现为 IL-1 β 、IL-6 和 iNOS 水平降低^[13]。而黄酮类化合物山奈酚能通过

mTOR 通路,抑制缺氧心肌细胞的凋亡^[14]。而其他成分如何发挥作用还有待研究。

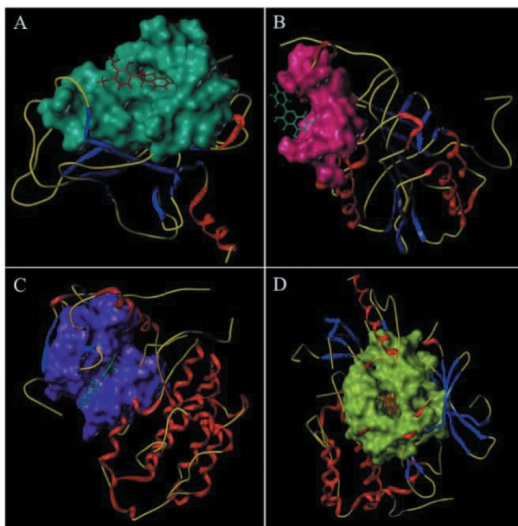


图9 黄芪活性成分与靶点分子对接模式

Fig. 9 Docking mode of Astragalix Radix active components and target molecules

注:A:TP53 与(3R)-3-(2-羟基-3,4-二甲氧基苯基)铬-7-醇;B:CASP3 与山奈酚;C:EGFR 与(3R)-3-(2-羟基-3,4-二甲氧基苯基)铬-7-醇;D:AKT1 与白桦脂酸。Note:A:TP53 and (3R)-3-(2-hydroxy-3,4-dimethoxyphenyl) chroman-7-ol;B:CASP3 and kaempferol;C:EGFR and (3R)-3-(2-hydroxy-3,4-dimethoxyphenyl) chroman-7-ol;D:AKT1 and mairin.

根据“黄芪活性成分-VMC-靶点”网络以及蛋白互作网络分析可知,能作用疾病的潜在靶点 97 个,可见黄芪治疗 VMC 具有多成分、多靶点的特点。重要的靶点蛋白(如 ALB、TP53、AKT1、MAPK3、VEGFA、CASP3、EGFR 等),它们的蛋白类型不同包括转录因子、信号转导因子、酶、转运因子等,这提示多靶点发挥协同治疗作用,这也体现了中医药治疗疾病的整体性与系统性。其中已有研究证明^[15,16],黄芪能显著降低心肌组织中凋亡相关因子 Caspase-3 的表达水平,减轻心肌细胞凋亡程度。而其他因子的影响情况可以作为今后研究切入的方向。

白介素(IL)、肿瘤坏死因子(TNF)是重要的促炎细胞因子,参与调节细胞炎症反应。多项研究证明^[17,18],黄芪治疗 VMC 后,血清中细胞炎症因子 IL-6、IL-8、TNF- α 水平显著降低,有效缓解患者体内炎症反应。STAT3(转录活化因子 3)信号通路被激活,会诱发心肌内源性保护机制,从而促进心肌血管生长,减慢心肌细胞凋亡^[19]。有研究发现,黄芪治疗 VMC 的过程中对 STAT3 及其通路有影响^[20],主要是影响病毒的复制,而对正常心肌细胞的功能不会产生影。此外,黄芪还能下调心肌组织中 Caspase-3 的表达^[16],来减轻心肌细胞凋亡程度。

其他靶点的作用方式值得进一步探索。

通过靶点 GO 富集分析,结果提示位于膜组织、转录因子复合体、免疫突触等细胞组分上的黄芪关键基因,可能通过影响潜在靶点与相关激酶、细胞因子受体、转录因子等的结合,从而调控营养水平、氧气水平、级联反应、应激反应等生物过程来治疗病毒性心肌炎的。靶细胞表面的 Fas 受体能与膜表面的 FasL 受体蛋白结合,可诱发靶细胞凋亡。Liu 等^[21]研究提示,黄芪或许是通过下调 VMC 小鼠心肌组织相关细胞表面的 FasL 与 Fas 基因转录,来减少 Fas 和 FasL 的表达发挥保护心肌作用。免疫突触可能也十分重要。Qi 等^[22]研究证明黄芪注射液能激活 Treg 细胞的免疫应答,进而分泌 IL-10 和 TNF- β ,抑制 Th17 细胞分泌 IL-17 和 IL-21,发挥保护心肌作用。Zhang 等^[15]的基础研究证明,黄芪三皂苷(AST)可以显著抑制小鼠外周血中肌酸激酶同工酶(CK-MB)及乳酸脱氢酶(LDH)水平。已有临床研究证明^[18],黄芪能通过抑制氧化应激的激活与扩散,减轻心肌损伤,从而起到保护心肌的作用。而营养条件和氧气供给对于心功能不足患者来说尤为重要,提示黄芪活性成分可能通过改善和调节患者的营养和氧气情况,来减轻心肌损伤的。有研究发

现^[17,23],黄芪抑制炎症反应发挥治疗 VMC 作用时,大多会下调 TNF- α 的表达。Zhong 等^[24]的基础研究证明,使用黄芪甲苷治疗后小鼠的心肌浸润和坏死积明显降低,病灶周围细胞凋亡指数明显减轻。由此证明,黄芪治疗 VMC 可能是多靶点、多通路的调节机制。

就目前已有的研究来看,黄芪治疗病毒性心肌炎机制较多,可能与氧化应激反应、抑制炎症反应、细胞凋亡、免疫调节等都存在一定的相关性。在 KEGG 通路富集分析后,提示这些机制或许与 PI3K-Akt 信号通路、TNF 信号通路、细胞凋亡通路及 Th17 细胞分化等信号通路有关。此外,还有一些尚未涉及的生物过程和通路(如糖尿病并发症中的 AGE-RAGE 信号通路、ErbB 信号通路、MAPK 信号通路、松弛素信号通路、人巨细胞病毒感染)有待发掘和验证。

基于网络药理学,本研究阐述了中药黄芪治疗病毒性心肌炎的活性成分、潜在作用靶点及发挥药效的生物学通路。研究结果初步揭示了黄芪治疗 VMC 的相关作用机制,为接下来深入研究其药理作用机制提供理论基础。然而,本研究还存在一定的不足,仅借助数据库现有已验证数据对黄芪治疗 VMC 的药效机制进行预测,还需要通过许多基础研究和临床研究进行验证。因此,本研究旨在为黄芪治疗病毒性心肌炎相关的作用机制提供思路 and 参考。

参考文献

- Hao HH. Clinical characteristics and treatment of viral myocarditis [J]. Guid Chin Med (中国医药指南), 2019, 17(2):121-122.
- Olejniczak M, Schwartz M, Webber E, et al. Viral myocarditis-incidence, diagnosis and management [J]. J Cardiothor Vasc An, 2020, 34:1591-1601.
- Yan Q, Wang KF. The experience of treating viral myocarditis by TCM syndrome [J]. Clin J Chin Med (中医临床研究), 2018, 10(29):20-22.
- Wang GF, Chen ZS. The progress of traditional Chinese medicine treatment for viral myocarditis [J]. Inner Mongolia J Tradit Chin Med (内蒙古中医药), 2019, 38(6):155-157.
- Li JG. Clinical study of the treatment of viral myocarditis with sodium creatis phosphate in jaundice injection [J]. Cardiovascular Dis J Integr Tradit Chin West Med (中西医结合心血管病电子杂志), 2020, 8(2):185-186.
- Wang Y, Wang L, Dong ZL. Clinical effect of astragalus injection combined with creatine phosphate sodium in the treatment of viral myocarditis [J]. Contemp Med (当代医学), 2019, 25(19):104-106.
- Liu S. Progress of Astragalus Radix and its effective monomer in treating viral myocarditis [J]. J North Pharm (北方药学), 2016, 13(1):90-91.
- Andrew LH. Network pharmacology: the next paradigm in drug discovery [J]. Nat Chem Biol, 2008, 4:682-690.
- Peng CW, He PC, Sun MW, et al. Research progress on network pharmacology in Chinese material medical [J]. Guangdong Chem Ind (广东化工), 2019, 46(23):53.
- Yao H, Ren JH, Hou YX, et al. Study on the mechanism of Astragalus Radix against liver cancer based on network pharmacology and molecular docking [J]. Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发), 2021, 33:1020-1031.
- Fan JX, Qin XM, Li ZY. Mechanism of Farfarae Flos in Qingfei Paidu Decoction against COVID-19 based on network pharmacology and molecular docking [J]. Chin Tradit Herbal Drugs (中草药), 2020, 51:2317-2325.
- Liu HL, Wu J, Huang XT. The protective effect of quercetin on Cocksackievirus B3-induced cardiomyocyte injury is based on the PI3K/AKT pathway [J]. Chin J Vir (病毒学报), 2020, 36:431-438.
- Liu CM, Ma JQ, Xie WR, et al. Quercetin protects mouse liver against nickel-induced DNA methylation and inflammation associated with the Nrf2/HO-1 and p38/STAT1/NF- κ B pathway [J]. Food Chem Toxicol, 2015, 82:19-26.
- Wang C, Guo CL, Li X, et al. Protective effects of kaempferol on hypoxic injury of myocardial cells through activation of mTOR pathway [J]. Chin J Immunol (中国免疫学杂志), 2019, 35:781-785.
- Zhang SZ, Liu TL, Zhang MJ, et al. Protective effect of AST on viral myocarditis via inhibiting CVB3-induced cardiomyocytes apoptosis [J]. Mol Cardiol Chin (中国分子心脏病学杂志), 2019, 19:2856-2860.
- Zhang YJ, Gou HP, Niu SM, et al. Effect of different dose of astragalus injection on the Caspase-3 activity of mice with viral myocarditis [J]. Chin Pediatr Integr Tradit West Med (中国中西医结合儿科学), 2017, 9(4):283-286.
- Lou C. Clinical effect of Huangqi Injection on viral myocarditis in children and its impact on cTnI and myocardial enzyme indicators [J]. Pract J Cardiac Cereb Pneum Vasc Dis (实用心脑血管病杂志), 2015, 23(8):108-110.
- Zhao ZX, Zhao ZM, Li T. Effect of Huangqi Injection on oxidative stress and inflammatory response in patients with viral myocarditis [J]. Chin J Exp Tradit Med Form (中国实验方剂学杂志), 2015, 21(23):176-179.