【基础研究】

基于网络药理学探讨丹蒌片治疗糖尿病心肌病的作用机制及RAGE/NF-κB/NLRP3信号通路验证

南晓强[1]，王艳丽[2]，姜小帆[1]，雷 鹏[1]，李娟娥[1]*
（1. 陕西省人民医院中医科，陕西西安 710068；2. 新疆维吾尔自治区中医医院中医科，新疆乌鲁木齐 830000）

摘要：目的 应用综合药理学策略系统评价丹蒌片的药理作用及分子机制，为其用于糖尿病心肌病（diabetic cardiomyopathy，DCM）的治疗提供理论基础。**方法** 从中药系统药理学分析平台中挖掘丹蒌片化学成分及作用靶点，建立丹蒌片“成分-靶点”相互作用网络；通过数据库筛选DCM所有作用靶点，构建“成分-疾病靶点”作用关系图，筛选其核心靶点，对核心靶点进行基因本体论分析及相关通路富集。以丹蒌片处理DCM大鼠模型，验证预测的重要信号通路。**结果** 从丹蒌片的10种重要配方中，共筛选出化合物节点190个、靶点节点275个。共筛选出丹蒌片与DCM相关靶点19个，在DCM中具有作用的靶点相关通路103条。在体内试验中，丹蒌片干预减少DCM大鼠心肌组织中纤维化相关因子信使RNA的表达，抑制晚期糖基化终末产物受体（receptor for advanced glycation end products，RAGE）/核因子（nuclear factor，NF）-κB/核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白（nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor protein，NLRP）3通路相关蛋白RAGE、NLRP3的表达，以及NF-κB（p65）蛋白的磷酸化。**结论** 丹蒌片通过阻断RAGE/NF-κB/NLRP3信号通路活化，抑制DCM大鼠心肌组织纤维化，进而抑制疾病进展。

关键词：网络药理学；丹蒌片；糖尿病心肌病；晚期糖基化终末产物受体/核因子-κB/核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白3信号通路

中图分类号：R587.2 **文献标志码：**A **文章编号：**1672-9188（2023）10-1034-09

DOI：10.13683/j.wph.2023.10.004

Study on mechanism of action of Danlou tablets in treating diabetic cardiomyopathy based on network pharmacology and validation of RAGE/NF-κB/NLRP3 signaling pathway

NAN Xiaoqiang[1], WANG Yanli[2], JIANG Xiaofan[1], LEI Peng[1], LI Juane[1]*
（*1. Department of Traditional Chinese Medicine, Shaanxi Provincial People's Hospital, Xi'an 710068, Shaanxi Province, China; 2. Department of Traditional Chinese Medicine, Xinjiang Uygur Autonomous Region Hospital of Traditional Chinese Medicine, Urumqi 830000, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China*）

Abstract: ***Objective*** To systematically evaluate the pharmacological effects and molecular mechanisms of Danlou tablets with comprehensive pharmacological strategies, and to provide a theoretical basis for the treatment of diabetic cardiomyopathy（DCM）. ***Methods*** The chemical constituents and targets of Danlou tablets were discovered from the platform of pharmacology analysis of traditional Chinese medicine system, and the interaction network of "component-target" was established. All the targets of DCM were screened through the database, the relationship diagram of "component-disease target" was constructed. The core targets were screened, and the gene ontology analysis and the related pathway

收稿日期：2023-02-06

作者简介：南晓强，主治医师，研究方向：中医药防治老年退行性疾病。

通信作者：李娟娥，副主任医师，博士，研究方向：中医药防治糖尿病及其并发症。

基金项目：陕西省自然科学基础研究计划（2021JM-549）；陕西省中医药管理局基础类项目（2021-ZZ-JC011）；陕西省人民医院科技人才支持计划（2021BJ-14）

enrichment were performed on the core targets. The DCM rat model was treated with Danlou tablets to verify the predicted important signaling pathways. ***Results*** A total of 190 compound nodes and 275 target nodes were screened from 10 important formulations of Danlou tablet. A total of 19 targets related to DCM were screened from Danlou tablet, and 103 target related pathways had role in DCM. *In vivo*, Danlou tablet reduced the expression of fibrosis-related factor messenger RNA in myocardium of DCM rats and inhibited the expression of receptor for advanced glycation end products (RAGE)/nuclear factor (NF)-κB/nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor protein (NLRP) 3 pathway-related proteins RAGE and NLRP3, and phosphorylation of NF-κB (p65) protein. ***Conclusion*** Danlou tablets can inhibit myocardial fibrosis in DCM rats by blocking the activation of RAGE/NF-κB/NLRP3 signaling pathway, and then inhibiting the progression of the disease.

Key words: network pharmacology; Danlou tablet; diabetic cardiomyopathy; receptor for advanced glycation end products/nuclear factor-κB/nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor protein 3 signaling pathway

糖尿病心肌病（diabetic cardiomyopathy，DCM）是糖尿病（diabetes mellitus，DM）重要的并发症之一，是 DM 患者在代谢紊乱及微血管病变基础上发生的一种心肌疾病[1—2]。DCM 可由炎症、氧化应激和脂毒性引发，患者可出现亚临床心功能异常，最终进展为心力衰竭（heart failure，HF）、心律失常及心源性休克，甚至猝死[3—6]。因 DCM 临床表现、诊断方法均无特异性而常被忽略，且无明确的药物干预方法，故其早期防治至关重要[7]。

DCM 属“消渴”“胸痹”“心悸”等范畴，目前中医药相关研究较少，且大多集中于益气、活血方面[8—9]。丹蒌片作为痰瘀同治的经典代表方，是治疗痰瘀互结所致胸痹的唯一且公认有效的药物，目前研究主要集中于降血脂、抗动脉粥样硬化、保护心肌和动脉内皮细胞方面[10—12]，尚无其对 DCM 防治的相关研究。

因心血管疾病病理变化复杂，且丹蒌片药效物质基础、药理作用机制尚不明确，故本研究基于网络药理学探讨丹蒌片治疗 DCM 的有效活性成分和作用靶点，揭示其分子作用机制，为丹蒌片在 DCM 治疗中的应用提供理论依据，为临床用药的创新提供思路借鉴，报道如下。

1 材料与方法

1.1 实验动物

选用 7 周龄 SPF 级 SD 雄性大鼠 75 只，体质量（300±15）g，购自陕西师范大学实验动物中心［生产许可证：SCXK（陕）2021-002，使用许可证：SYXK（陕）2021-003］，饲养于室温 20 ℃～25 ℃，相对湿度 52%，12 h 光照 /12 h 黑暗交替的全封闭 SPF 级状态下的实验动物中心，分笼饲养，每笼 15 只饲养 7 d，保证动物自由进食与饮水。

1.2 试剂与仪器

丹蒌片（J740634，吉林康乃尔药业有限公司）；链脲佐菌素（streptozotocin，STZ，18883-66-4，美国 Sigma 公司）；二甲双胍（1115-70-4，美国 Sigma 公司）；双吡啶甲酸（bicinchoninic acid，BCA）蛋白定量试剂盒（北京索莱宝科技有限公司）；anti- 晚期糖基化终末产物受体（receptor for advanced glycation end products，RAGE）抗体、anti- 核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白（nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor protein，NLRP）3 抗体、anti- 核因子（nuclear factor，NF）-κB（p65）抗体、anti- 磷酸化（phosphorylation，p）-NF-κB（p65）抗体及辣根过氧化酶标记的山羊抗兔抗体（Abcam 公司）。实时荧光定量聚合酶链反应（real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction，RT-qPCR）仪（PISM7500 型，美国 ABI 公司）；化学发光成像系统（Tanon 5200，上海天能科技有限公司）；多功能酶标仪（Tecan Infinite M1000 Pro，瑞士 Tecan 公司）；全自动蛋白质印迹（western blotting，WB）定量分析

系统（普诺森生物科技有限公司）；小动物超声成像系统（Vevo2100，VisualSonics）。

1.3 方法

1.3.1 丹蒌片化学成分的查找与筛选

利于中药系统药理学分析平台（traditional Chinese medicine systems pharmacology database and analysis platform，TCMSP）以丹蒌片全方的10个组方，即“瓜蒌”“薤白”“葛根”“川芎”“丹参”“赤芍”“泽泻”“黄芪”“骨碎补”“郁金”为关键词，对所有组分的化学成分进行检索。设置化学成分的药代动力学参数，筛选条件为脂水分配系数≤5、口服生物利用度≥30%、类药性≥0.18，删除重复或无靶点的活性成分，最终确定丹蒌片的化学成分。

1.3.2 成分-靶点网络的构建

通过TCMSP对筛选出的化合物靶点进行检索整理；采用Cytoscape3.2.1对“成分-靶点”网络图进行构建，以探究丹蒌片治疗DCM的作用机制。

1.3.3 DCM疾病靶点的筛选

以“diabetic cardiomyopathy”为关键词检索DCM相关基因，分别从疾病基因网络（Disease Gene Network，DisGeNET）、在线人类孟德尔遗传（Online Mendelian Inheritance in Man，OMIM）、京都基因和基因组数据库（Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes，KEGG）中获取信息，运用Excel合并数据并剔除重合基因（相同Entry ID），获得与DCM相关的基因和靶蛋白信息。

1.3.4 丹蒌片“成分-靶点”与DCM“疾病-靶点”交集网络的构建

运用Excel筛选DCM靶点与丹蒌片活性成分靶点，以Entry ID为查询条件，映射出丹蒌片中每一活性成分与DCM相关靶蛋白重合（交集）Entry ID部分，获得丹蒌片活性成分作用靶蛋白和DCM作用靶蛋白交集的关键靶点，并获取蛋白名、基因名和Uniprot ID。整合筛选出交集关键靶点，构建“成分-靶点-疾病”网络，以＞平均自由度为筛选条件，筛选出核心靶点网络。

1.3.5 丹蒌片与DCM疾病核心靶点通路富集分析

运用Cytoscape3.7.1中Cluo基因本体（gene ontology，GO）插件GO biological process及R语言中的clusterProfiler包，分析丹蒌片活性成分抗DCM核心靶点的生物过程，对获取的丹蒌片“成分-靶点-疾病”进行生物过程和调控通路富集分析。

1.3.6 DCM模型的建立

将“**1.1**”中的大鼠随机选取60只进行高脂、高糖喂养4周后，禁食12 h，腹腔注射2%的STZ注射液（一日25 mg/kg），连续注射2 d，诱导DM模型。于末次注射STZ后48 h和72 h，分别测空腹血糖（fasting blood glucose，FBG），连续两次FBG≥11.1 mmol/L视为造模成功。

1.3.7 分组与给药

将造模成功的大鼠随机分为模型组、二甲双胍组（一日0.1 g/kg）、丹蒌片低剂量组（一日0.46 g/kg）、丹蒌片高剂量组（一日2.3 g/kg），每组15只。另取15只同龄未造模的SD大鼠纳入对照组。对照组喂以普通饲料，其余各组喂以高脂饲料。均进行灌胃治疗，对照组和模型组给予等体积生理盐水，一日1次，干预12周。

1.3.8 检测指标与方法

1.3.8.1 RT-qPCR检测心肌组织纤维化相关因子信使RNA（messenger RNA，mRNA）表达

采用TRIzol试剂提取各组大鼠心肌组织总RNA，使用核酸蛋白浓度测定仪检测样品RNA浓度、纯度。根据互补DNA（complementary DNA，cDNA）合成试剂盒说明书将等量RNA反转录成cDNA。利用RT-qPCR试剂盒在miScript SYBR Green PCR Kit系统中进行实时定量PCR。RT-qPCR反应体系为2.0 μl cDNA、10.0 μl Mix、0.8 μl上游引物（10 μmol/L）、0.8 μl下游引物（10 μmol/L）、6.4 μl无RNase的超纯水，循环条件为95 ℃、3 min，之后进行35个循环（95 ℃、35 s，58 ℃、45 s，72 ℃、30 s，72 ℃、10 min）。利用甘油醛-3-磷酸脱氢酶（glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase，*GAPDH*）作为内参基因，

通过 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法分析基因相对表达。

1.3.8.2 WB 法检测心肌组织 RAGE、NF-κB、p-NF-κB 及 NLRP3 蛋白表达

以含有蛋白酶抑制剂的放射免疫沉淀法裂解缓冲液，裂解大鼠心肌组织，高速离心后收集上清液。提取蛋白质后，使用 BCA 蛋白质检测试剂盒测量蛋白质浓度。通过聚丙烯酰胺凝胶电泳分离等量蛋白质（20 μg/ 孔），然后转移至聚偏二氟乙烯膜上。随后将蛋白质在 5% 的脱脂牛奶中室温封闭 1 h。加入一抗 anti-RAGE 抗体（1 ∶ 600）、anti-NF-κB（p65）抗体（1 ∶ 600）、anti-p-NF-κB（p65）抗体（1 ∶ 600）及 anti-NLRP3 抗体（1 ∶ 600），在 4 ℃下孵育过夜。此后，用 TBST 缓冲液冲洗膜，然后将膜用二抗山羊抗兔免疫球蛋白（immunoglobulin，Ig）G H&L（1 ∶ 1 000）在室温下孵育 1 h。用 TBST 洗膜 3 次后，在膜上加入增强化学发光试剂显示蛋白条带，检测印迹，并使用 Molecular Imager® VersaDoc™ MP5000 系统捕获图像，*GAPDH* 作为内参基因。

1.3.9 统计学方法

采用 SPSS19.0 软件处理数据，用 $(\bar{x}\pm s)$ 表示。组间比较满足方差齐性时，用单因素方差分析（one-way ANOVA）；不满足方差齐性时，用非参数检验。以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 丹蒌片活性化合物基本信息

通过 TCMSP 对丹蒌片全方中 10 种中药的所有化学成分进行查找，共搜集 1 121 个化合物，其中瓜蒌 80 个，薤白 87 个，葛根 18 个，川芎 189 个，丹参 202 个，赤芍 119 个，泽泻 46 个，黄芪 87 个，骨碎补 71 个，郁金 222 个。去除重复化合物，筛选最终得到符合相应条件的化合物 190 个，作为候选化合物。

2.2 DCM 相关靶点获取

从数据库 DisGeNET 中获取关于 DCM 靶点的信息 53 条、OMIM 中关于 DCM 靶点的信息 200 条，见表 1。

2.3 丹蒌片“化合物 - 靶点”相互作用网络

构建丹蒌片“化合物 - 靶点”相互作用网络。在“化合物 - 靶点”相互作用网络中，共包括 404 个节点（10 个药物、135 个化合物节点、275 个成分靶点）和 2 109 条边。在数据处理过程中，MOL007175 等 55 个成分还未在该数据库中有相关靶点，故在构建“化合物 - 靶点”网络图时，只显示相关的 135 个化合物。

化合物 XB-11、HQ-20 的靶点最多（144 个），其作用最丰富；其次是 HQ-15、GSB-06（60 个）。另外，在网络中靶点 PTGS2 存在相互作用的成分最多（93 个），其次为 PTGS1（62 个）。在挖掘出的靶点中仅 55 个靶点具有单一配体，其余靶点均存在多个配体。

2.4 丹蒌片“活性成分 - 靶点 -DCM”网络构建与分析

构建丹蒌片“活性成分 - 靶点 -DCM”网络，相关信息见表 2、图 1。该网络由 85 个节点和 179 条边组成，其中包括 8 味中药，58 个成分节点，19 个蛋白靶点节点。图 1 中，红色圆形代表药物，黄色菱形代表成分节点，绿色三角形代表蛋白靶点节点。这里的 19 个蛋白靶点既是丹蒌片的作用靶点，亦是 DCM 的相关作用靶点。

2.5 丹蒌片“药物 - 关键靶点 - 疾病”生物学功能富集分析

通过 Clue GO 对筛选出的 19 个靶点蛋白进行通路富集分析，主要生物过程见图 2。其主要涉及前 5 的通路分别为活性氧（reactive oxygen species，ROS）代谢过程调节、葡萄糖转运膜调节以及细胞因子分泌等。

2.6 KEGG 通路分析

通过 KEGG 挖掘分析得到 103 条通路，主要生物过程见图 3。其主要涉及前 3 的信号通路分别为血流剪切应力信号转导与动脉粥样硬化、AGEs/RAGE 信号通路相关 DM 并发症和百日咳。

2.7 各组心肌纤维化相关因子 mRNA 比较

较对照组，模型组心肌组织胶原蛋白Ⅰ、胶原蛋白Ⅲ、基质金属蛋白酶（matrix metalloproteinase，

表 1 DCM 相关靶点信息

Table 1 DCM related target information

数据库	基因名称												
DisGeNET	*ATP2A2*	*KLK1*	*SPP1*	*APOA1*	*AGTR2*	*INS*	*TNF*	*IGF1*	*RYR2*	*SLC25A4*	*CALM1*	*FGF1*	*FN1*
	EDN1	*PLN*	*REN*	*HNF1A*	*BEST1*	*NR1I2*	*NECTIN1*	*LONP1*	*MIR22*	*TXNRD3*	*PHB*	*NPPA*	*NGF*
	CAMKMT	*TERF2IP*	*MAT2B*	*RABGEF1*	*RAP1A*	*DAPK2*	*INPP5F*	*OGA*	*TXNIP*	*ATP6AP2*	*NFE2L2*	*MYH6*	*MAOA*
	MIAT	*PIM1*	*EPO*	*DECR1*	*CYP2J2*	*CRP*	*KRIT1*	*CAV3*	*CALM3*	*CALM2*	*LEP*	*KNG1*	*AGT*
	GJA1												
OMIM	*CMM*	*DEL1p36*	*ATAD3A*	*GNB1*	*SKI*	*PRDM16*	*TP73*	*MIG6*	*NPPA*	*MFN2*	*MSH6*	*SIAT9*	*NR4A2*
	TNFRSF8	*CTRC*	*CELA2A*	*PLEKHM2*	*CLCNKA*	*PADI4*	*PINK1*	*DDOST*	*ECE1*	*CELA3B*	*PPP3R1*	*CD8A*	*DCAF17*
	E2F2	*SELENON*	*NR0B2*	*SDC3*	*CCDC28B*	*LCK*	*HDAC1*	*GJA4*	*TRIT1*	*ZMPSTE24*	*BMP10*	*EIF2AK3*	*GLI2*
	ZFP69	*PPCS*	*YBX1*	*SLC2A1*	*CYP4B1*	*CYP4A11*	*TAL1*	*CPT2*	*PARS2*	*OMA1*	*ANTXR1*	*COPD*	*DPP4*
	MYSM1	*AIR*	*PAOD1*	*KANK4*	*ANGPTL3*	*PGM1*	*LEPR*	*LEPROT*	*SGIP1*	*TNNI3K*	*GFPT1*	*ANKRD23*	*TTN*
	ACADM	*NEXN*	*UOX*	*CYR61*	*AGL*	*ALX3*	*SLC16A1*	*PTPN22*	*NRAS*	*VANGL1*	*TIA1*	*COA5*	*NPHP1*
	WARS2	*NOTCH2*	*HJV*	*GJA5*	*CRTC2*	*TPM3*	*IL6R*	*SHC1*	*FLAD1*	*DPM3*	*DYSF*	*MGAT4A*	*LIMS2*
	YY1AP1	*RIT1*	*LMNA*	*BGLAP*	*CD1D*	*APCS*	*CRP*	*PEA15*	*DCAF8*	*NCSTN*	*ALMS1*	*PROC*	*IDDM19*
	CD244	*USF1*	*NDUFS2*	*MPZ*	*FCGR2B*	*ATF6*	*RGS5*	*PBX1*	*MGST3*	*ILDR2*	*NAT8*	*IFIH1*	*CMD1H*
	GPR161	*ATP1B1*	*SLC19A2*	*F5*	*SELP*	*SELE*	*RC3H1*	*MRPS14*	*TOR1AIP1*	*HMCN1*	*DGUOK*	*TMEM87B*	*CXCR4*
	CFH	*CFHR3*	*CFHR1*	*PTPRC*	*TNNT2*	*ADIPOR1*	*SOX13*	*PPP1R15B*	*AVPR1B*	*IL10*	*BOLA3*	*SMPD4*	*IDDM7*
	CR2	*CR1*	*CD34*	*HSD11B1*	*KCNH1*	*SLC30A10*	*RAB3GAP2*	*MDC1B*	*PARP1*	*PSEN2*	*IL1A*	*CMYA3*	*IL1B*
	ACTA1	*AGT*	*ARV1*	*COA6*	*IRF2BP2*	*ERO1LB*	*ACTN2*	*RYR2*	*COX20*	*NLRP3*	*HK2*	*ZEB2*	*FGQTL1*
	HYT3	*KLF11*	*LPIN1*	*NBAS*	*ADCY3*	*POMC*	*DNMT3A*	*HADHA*	*HADHB*	*KHK*	*REG1A*	*G6PC2*	*GAD1*
	UCN	*GCKR*	*STRN*	*SOS1*	*LEPQTL1*	*THADA*	*PLEKHH2*	*LRPPRC*	*SIX3*	*TTC7A*	*SUCLG1*	*IL1RN*	*INSIG2*
	GPD2	*NFE2L2*	*RNU4ATAC*	*GCG*	*NEUROD1*								

MMP)-1 和 MMP-9 的 mRNA 表达水平显著升高（$P<0.01$）；较模型组，二甲双胍治疗组和丹蒌片治疗组心肌组织前述 4 个指标的 mRNA 表达水平显著降低（$P<0.01$）；较低剂量丹蒌片治疗组，高剂量丹蒌片治疗组心肌组织前述 4 个指标的 mRNA 表达水平下降更显著（$P<0.01$）。见表 3。

2.8 各组心肌组织 RAGE/NF-κB/NLRP3 通路相关蛋白表达比较

与对照组相比，模型组心肌组织 RAGE/NF-κB/NLRP3 通路相关蛋白 RAGE 表达水平显著升高（$P<0.01$）；较模型组，二甲双胍组和丹蒌片治疗组心肌组织 RAGE 蛋白表达水平降低（$P<0.05$），尤其是高剂量丹蒌片治疗组（$P<0.01$）。模型组心肌组织 NF-κB 磷酸化水平、NLRP3 蛋白表达水平较对照组显著升高（$P<0.01$）；较模型组，二甲双胍治疗组和丹蒌片治疗组心肌组织 p-NF-κB、NLRP3 蛋白表达水平降低（$P<0.05$）；较低剂量丹蒌片治疗组，高剂量丹蒌片治疗组心肌组织 p-NF-κB、NLRP3 蛋白表达水平更低（$P<0.01$）。见表 4。

表 2 丹蒌片“活性成分 - 靶点 -DCM”网络信息

Table 2 Network information of "active ingredient-target-DCM" of Danlou tablet

药物	编号	成分	靶点	基因名
瓜蒌	GL-02	香叶木素	二肽基肽酶Ⅳ	*DPP4*
瓜蒌	GL-02	香叶木素	钙调蛋白	*CALM1*
薤白	XB-11	槲皮素	白介素-10	*IL10*
薤白	XB-11	槲皮素	肿瘤坏死因子	*TNF*
薤白	XB-11	槲皮素	间隙连接α-1蛋白	*GJA1*
薤白	XB-11	槲皮素	白介素-1β	*IL1B*
薤白	XB-11	槲皮素	E-选择素	*SELE*
薤白	XB-11	槲皮素	核受体亚家族1Ⅰ组成员2	*NR1I2*
薤白	XB-11	槲皮素	白介素-1α	*IL1A*
薤白	XB-11	槲皮素	聚（ADP-核糖）聚合酶1	*PARP1*
薤白	XB-11	槲皮素	核因子红细胞2相关因子2	*NFE2L2*
薤白	XB-11	槲皮素	C反应蛋白	*CRP*
薤白	XB-11	槲皮素	骨桥蛋白	*SPP1*
薤白	XB-11	槲皮素	转录因子E2F2	*E2F2*
薤白	XB-11	槲皮素	己糖激酶-2	*HK2*
葛根	GG-01	芒柄花黄素	原癌基因丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶Pim-1	*PIM1*
丹参	DS-32	隐丹参酮	内皮素-1	*EDN1*
丹参	DS-63	丹参酮ⅡA	内皮素转化酶1	*ECE1*
骨碎补	GSB-04	豆甾醇	胺氧化酶（含黄素）A	*MAOA*

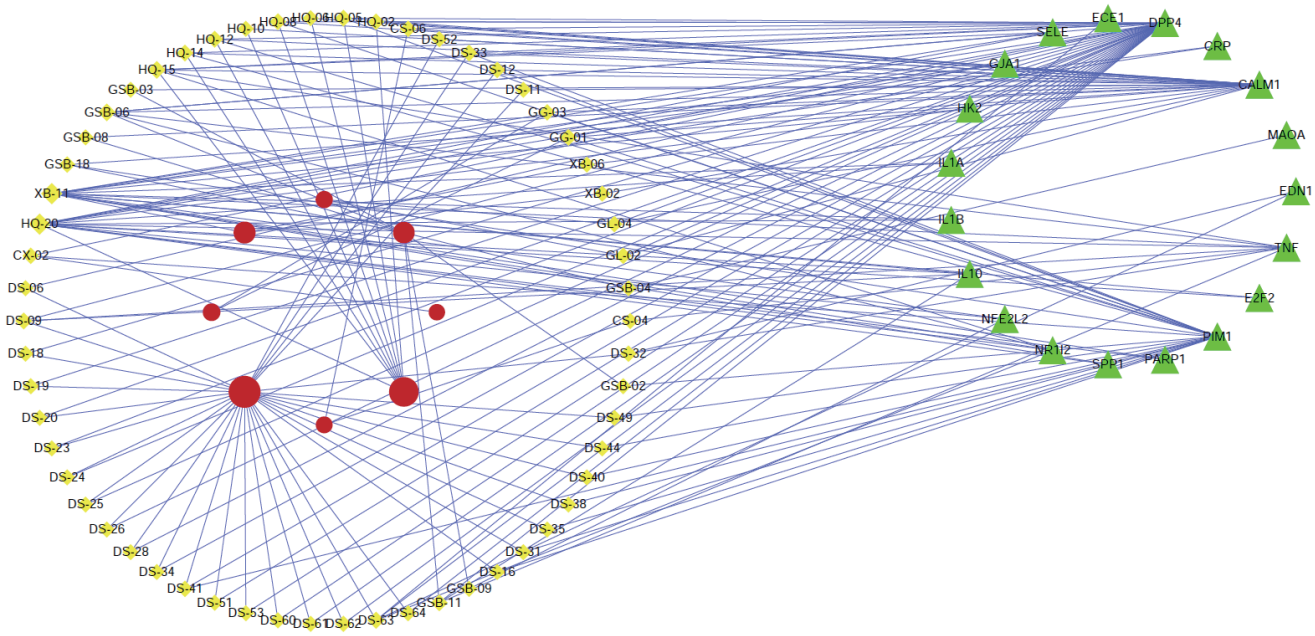


图 1　丹蒌片“活性成分 - 靶点 -DCM”相互作用网络图

Figure 1　Interaction network diagram of "active ingredient-target-DCM" **of Danlou tablet**

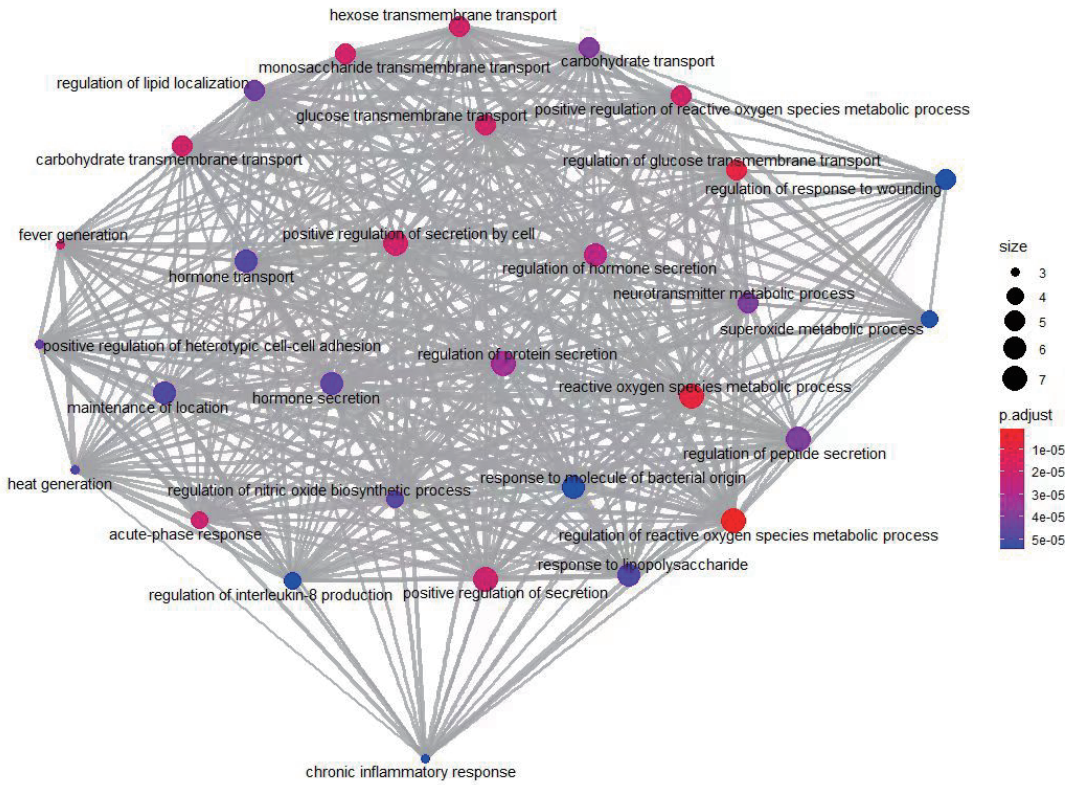


图 2　丹蒌片“药物 - 关键靶点 - 疾病”**Clue GO** 富集生物过程相互作用关系图

Figure 2　Interaction between biological processes of "drug-key target-disease" **Clue GO enrichment of Danlou tablet**

3 讨论

心血管并发症是导致 DM 患者发病甚至死亡的主要原因。虽然缺血在 DM 心脏并发症中占主导地位，但普遍认为在无明显心肌缺血和高血压的情况下，HF 的发生风险亦会增加或进展加速[13]。由于 DCM 复杂的病因和病机，“一个靶点，一种药物”的方法效果并不理想[14]。网络药理学作为一种通过大数据分析进行药物研究的新兴方法，有助于更好地理解药物的药理机制[15]，故其在中医研究中被广泛应用。

丹蒌片是目前治疗胸痹痰瘀互结证的唯一且公认有效的药物，已入选国家中药药典和 2014 — 2016 年中西医结合心脏病康复治疗专家共识[16—17]。该药具有宽胸通阳、化痰散结、活血化瘀等功效，体现了“痰瘀同治”的原则，能有效减轻胸痹患者临床症状、提高生活质量及改善预后[11]。目前，对丹蒌片的研究主要集中于降血脂、抗动脉粥样硬化、保护心肌及动脉内皮细胞方面，其机制主要与激活 NF-κB 信号通路、降低炎性因子表达有关[10—12]。本研究构建了丹蒌片“活性成分 -DCM 靶点”网络并进行了通路富集分析，阐明了丹蒌片治疗 DCM 的分子机制。之后在 DCM 大鼠中进行验证，发现丹蒌片

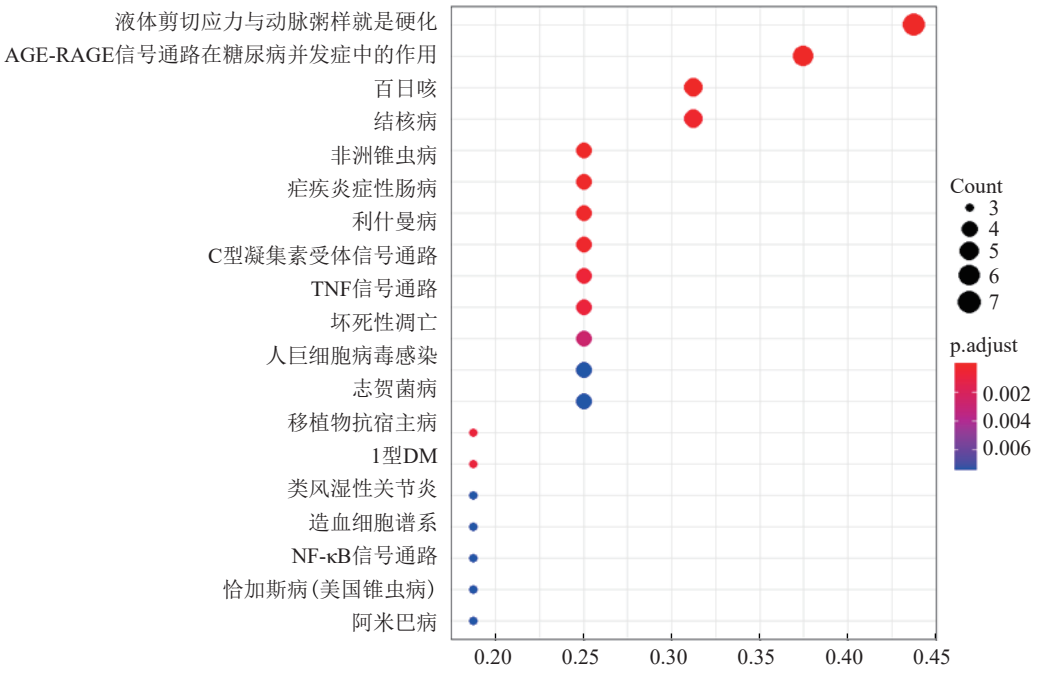


图 3 丹蒌片“药物 - 关键靶点 - 疾病”Clue GO 富集生物过程图

Figure 3 Biological process diagram of "drug-key target-disease" Clue GO enrichment of Danlou tablet

表 3 丹蒌片对 DCM 大鼠心肌组织纤维化因子 mRNA 表达的影响

Table 3 Effects of Danlou tablets on the mRNA expression of fibrosis factors in cardiac tissue of DCM rats

药物	对照组（n=15）	DCM模型组（n=15）	丹蒌片低剂量组（n=15）	丹蒌片高剂量组（n=15）	二甲双胍组（n=15）	F值	P值
胶原蛋白Ⅰ	1.01±0.09	2.47±0.12	1.89±0.08	1.05±0.16	1.15±0.16	11.416	＜0.001
胶原蛋白Ⅲ	1.03±0.07	3.35±0.46	2.38±0.44	1.18±0.25	1.35±0.23	17.531	＜0.001
MMP-1	1.02±0.09	3.17±0.12	2.23±0.48	1.10±0.36	1.21±0.16	21.138	＜0.001
MMP-9	1.01±0.05	3.52±0.26	2.02±0.37	1.08±0.13	1.31±0.17	13.201	＜0.001

表 4 丹蒌片对 DCM 大鼠心肌组织 RAGE/NF-κB/NLRP3 通路相关蛋白表达的影响

Table 4 Effects of Danlou tablet on the RAGE/NF-κB/NLRP3 pathway related protein expression in myocardial tissue of DCM rats

药物	对照组（n=15）	DCM模型组（n=15）	丹蒌片低剂量组（n=15）	丹蒌片高剂量组（n=15）	二甲双胍组（n=15）	F值	P值
RAGE	1.01±0.05	2.89±0.25	1.68±0.18	1.15±0.16	1.35±0.16	6.329	＜0.001
NLRP3	1.03±0.04	2.93±0.32	2.38±0.24	1.18±0.15	1.15±0.13	12.154	＜0.001
p-p65/t-p65	1.02±0.05	2.85±0.16	2.02±0.37	1.15±0.13	1.11±0.14	3.271	＜0.001

确能抑制大鼠疾病进展。

本研究筛选出丹蒌片与 DCM 相关核心靶点 19 个，表明这些靶点可能在丹蒌片治疗 DCM 中发挥关键作用。后通过 Clue GO 对筛选出的 19 个靶点蛋白进行通路富集分析。其主要涉及前 5 的通路分别为 ROS 代谢过程的调节、葡萄糖转运膜调节以及细胞因子分泌等。此外，通过 KEGG 挖掘分析得到 103 条通路，其主要涉及前 3 的信号通路分别为血流剪切应力信号转导与动脉粥样硬化、AGEs/RAGE 信号通路相关 DM 并发症和百日咳。而 AGEs-RAGE 通路被报道在 2 型 DM 大鼠心肌纤维化中具有重要价值[18]。故推测丹蒌片治疗 DCM 可能是通过参与 AGEs/RAGE 信号通路活化发挥作用。

二甲双胍是一种双胍衍生物，具有良好降糖作用，是 2 型 DM 的一线治疗药物[19]，其通过上调单磷酸腺苷活化蛋白激酶活性，抑制高糖诱导的心肌细胞线粒体功能障碍和凋亡[20]。本研究显示，丹蒌片的干预显著降低 DCM 大鼠心肌组织中胶原蛋白Ⅰ、胶原蛋白Ⅲ、MMP-1 和 MMP-9 的表达水平，抑制了 RAGE/NF-κB/NLRP3 通路相关蛋白 RAGE 和 NLRP3 的表达，以及 NF-κB（p65）蛋白的磷酸化。故推测丹蒌片通过阻断 RAGE/NF-κB/NLRP3 通路活化以抑制 DCM 大鼠心肌组织纤维化，进而抑制 DCM 进展。

4 结论

本研究通过网络药理学分析鉴定了丹蒌片 10 味中药中的有效化合物，分析和验证了中枢靶点和中枢信号通路，证明丹蒌片可通过阻断 RAGE/NF-κB/NLRP3 通路活化以抑制 DCM 大鼠心肌组织纤维化，进而在抗 DCM 中发挥作用。

参考文献：

[1] Dillmann WH. Diabetic cardiomyopathy[J]. Circ Res, 2019, 124(8): 1160-1162.

[2] Avagimyan A, Popov S, Shalnova S. The pathophysiological basis of diabetic cardiomyopathy development[J]. Curr Probl Cardiol, 2022, 47(9): 101156.

[3] Ke J, Pan J, Lin H, *et al*. Diabetic cardiomyopathy: a brief summary on lipid toxicity[J]. ESC Heart Fail, 2023, 10(2): 776-790.

[4] Ramesh P, Yeo JL, Brady EM, *et al*. Role of inflammation in diabetic cardiomyopathy[J]. Ther Adv Endocrinol Metab, 2022, 13: 20420188221083530.

[5] Nakamura K, Miyoshi T, Yoshida M, *et al*. Pathophysiology and treatment of diabetic cardiomyopathy and heart failure in patients with diabetes mellitus[J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(7): 3587.

[6] De Geest B, Mishra M. Role of oxidative stress in diabetic cardiomyopathy[J]. Antioxidants(Basel), 2022, 11(4): 784.

[7] Zhao X, Liu S, Wang X, *et al*. Diabetic cardiomyopathy: clinical phenotype and practice[J]. Front Endocrinol (Lausanne), 2022, 13: 1032268.

[8] Han S, Hou Y, Liu H, *et al*. The efficacy and safety of traditional Chinese medicine treating diabetic cardiomyopathy: a protocol for systematic review and meta-analysis[J]. Medicine(Baltimore), 2022, 101(47): e31269.

[9] Tan Y, Zhang Z, Zheng C, *et al*. Mechanisms of diabetic cardiomyopathy and potential therapeutic strategies: preclinical and clinical evidence[J]. Nat Rev Cardiol, 2020, 17(9): 585-607.

[10] 李增, 张明雪. 基于复方网络药理学和分子对接技术研究丹蒌片治疗冠心病的作用机制[J]. 辽宁中医杂志, 2023, 50(1): 120-124.

[11] 黄颂波. 丹蒌片联合瑞舒他汀治疗老年冠心病的效果及对血管内皮功能、运动耐力的影响[J]. 医学理论与实践, 2022, 35(8): 1304-1306.
[12] 孙秀华, 马元, 钱琳艳, 等. 丹蒌片对痰瘀互结型急性冠状动脉综合征患者经皮冠状动脉介入治疗后心绞痛症状和心功能的影响[J]. 中华危重症医学杂志: 电子版, 2022, 15(5): 367-371.
[13] Bergsten TM, Nicholson A, Donnino R, *et al*. Predicting adults likely to develop heart failure using readily available clinical information: an analysis of heart failure incidence using the NHEFS[J]. Prev Med, 2020, 130: 105878.
[14] Prandi FR, Evangelista I, Sergi D, *et al*. Mechanisms of cardiac dysfunction in diabetic cardiomyopathy: molecular abnormalities and phenotypical variants[J]. Heart Fail Rev, 2023, 28(3): 597-606.
[15] Zhao L, Zhang H, Li N, *et al*. Network pharmacology, a promising approach to reveal the pharmacology mechanism of Chinese medicine formula[J]. J Ethnopharmacol, 2023, 309: 116306.
[16] 刘勇, 刘超峰. 丹蒌片药理作用及临床应用研究进展[J]. 河北医药, 2019, 41(18): 2861-2865.
[17] 韩秀江, 高晟. 丹蒌片在痰瘀互结型冠心病患者中的应用进展[J]. 医疗装备, 2020, 33(14): 187-188.
[18] Hongwei Y, Ruiping C, Yingyan F, *et al*. Effect of Irbesartan on AGEs-RAGE and MMPs systems in rat type 2 diabetes myocardial-fibrosis model[J]. Exp Biol Med(Maywood), 2019, 244(7): 612-620.
[19] Majety P, Lozada Orquera FA, Edem D, *et al*. Pharmacological approaches to the prevention of type 2 diabetes mellitus[J]. Front Endocrinol(Lausanne), 2023, 14: 1118848.
[20] Wu Y. Metformin inhibits mitochondrial dysfunction and apoptosis in cardiomyocytes induced by high glucose via upregulating AMPK activity[J]. Exp Biol Med(Maywood), 2023: 15353702231191178.

（编辑：虞 瑛）

广 告 索 引

封二	山东罗欣药业集团股份有限公司	前彩插1	赛诺菲(中国)投资有限公司
封三	CSL Behring	前彩插2	山东齐鲁制药集团有限公司
封底	中国医药工业信息中心	1054页：	公益广告