

基于网络药理学分析瓜蒌薤白配伍抗心力衰竭的作用机制研究

邹纯才¹, 鄢海燕^{1*}, 魏美玲²

(1. 皖南医学院药学院, 安徽 芜湖 241002; 2. 安徽省第二人民医院药学部, 安徽 合肥 230041)

摘要: 基于网络药理学预测及大鼠心肌缺血-再灌注损伤模型验证的方法, 对瓜蒌薤白配伍抗心力衰竭的作用机制进行探讨。运用 Traditional Chinese Medicine Database@Taiwan (TCM Database@Taiwan)、Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology Database and Analysis Platform (TCMSP)、Drug Repositioning and Adverse Drug Reaction Chemical-Protein Interactome (DRAR-CPI)、Universal Protein Resource (Uniprot) 数据库进行化合物筛选及活性成分靶点预测, 借助 Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery (DAVID) 数据库进行生物途径和信号通路分析, 预测瓜蒌薤白配伍的作用机制。考察瓜蒌薤白滴丸预处理对心肌缺血-再灌注损伤大鼠心肌细胞凋亡及相关信号通路磷脂酰肌醇 3-激酶/丝氨酸苏氨酸激酶 (phosphatidylinositol-3-kinase/protein kinase B, PI3K/Akt) 中 Akt、磷酸化丝氨酸/苏氨酸激酶 (phosphorylated protein kinase B, p-Akt) 和半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3 (cysteine aspartate-specific proteinase, caspase-3) 蛋白表达的影响。发现 10 α -cucurbita-5,24-diene-3 β -ol 和 macrostemonoside 等 22 个化合物通过多靶点、多生物途径及多通路方式协同抗心力衰竭, 涉及激素刺激反应、磷酸化过程、细胞凋亡调控等生物学途径和胰岛素、丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK)、细胞凋亡等信号通路。瓜蒌薤白滴丸预处理可通过激活 PI3K-Akt 信号通路, 促进 Akt 蛋白磷酸化, 降低 caspase-3 蛋白表达, 发挥抑制细胞凋亡、保护心肌作用, 验证了网络药理学结果, 综合阐释了瓜蒌薤白配伍抗心力衰竭的作用机制。

关键词: 瓜蒌薤白; 配伍; 心力衰竭; 网络药理学; 心肌缺血再灌注损伤

中图分类号: R966

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2018) 09-1406-08

Study of the anti-heart failure mechanisms of compatibility of Gualou with Xiebai in basis of network pharmacology

ZOU Chun-cai¹, YAN Hai-yan^{1*}, WEI Mei-ling²

(1. Pharmacy School of Wannan Medical College, Wuhu 241002, China;

2. Pharmacy Department of Anhui No.2 Provincial People's Hospital, Hefei 230041, China)

Abstract: This study was designed to explore the anti heart failure mechanisms of the compatibility of Gualou with Xiebai based on network pharmacology in rat model of myocardial ischemia-reperfusion injury. Using the databases of Traditional Chinese Medicine Database@Taiwan (TCM Database@Taiwan), Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology Database and Analysis Platform (TCMSP), Drug Repositioning and Adverse Drug Reaction Chemical-Protein Interactome (DRAR-CPI) and Universal Protein Resource (Uniprot) to screen compounds and predict the target of active components, the Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery (DAVID) database, we predicted the biological pathway and signal pathway in the compatibility of Gualou with Xiebai. The effects of Gualou Xiebai dropping pills on the apoptosis of

收稿日期: 2018-04-27; 修回日期: 2018-06-03.

基金项目: 安徽高校省级自然科学研究重大项目 (KJ2015ZD41, KJ2016SD60).

*通讯作者 Tel: 86-533-3932185, E-mail: yhy0801@126.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2018-0394

myocardial cells and the expression of protein kinase B (Akt), p-Akt and cysteine aspartate-specific proteinase (caspase-3) protein were examined in the related signal pathway phosphatidylinositol-3-kinase/protein kinase B (PI3K/Akt) of myocardial ischemia reperfusion injury in rats. Twenty two compounds, such as 10 α -cucurbita-5,24-diene-3 β -ol and macrostemonide were found to protect rats from heart failure through multiple targets, multiple biological pathways and multiple pathways, involving biological pathways such as hormone stimulation reaction, phosphorylation, apoptosis regulation, and signaling pathways such as insulin, mitogen-activated protein kinase (MAPK), cell apoptosis and so on. After the intervention of Gualou Xiebai dropping pills, the PI3K-Akt signaling pathway was activated to promote the phosphorylation of Akt protein, reduce the expression of caspase-3 protein, inhibit apoptosis and protect the myocardium. The data verify the results of the network pharmacology, and explain the mechanisms of anti-heart failure activity of combination of Gualou with Xiebai.

Key words: Gualou-Xiebai; compatibility; heart failure; network pharmacology; myocardial ischemia reperfusion injury

瓜蒌为葫芦科植物栝楼 (*Trichosanthes kirilowii* Maxim.) 或双边栝楼 (*Trichosanthes rosthornii* Harms.) 的成熟果实^[1], 主产于河南、河北、山东、安徽等地, 具宽胸散结之功效, 用于胸痹心痛等。薤白为百合科植物小根蒜 (*Allium macrostemon* Bge.) 或薤 (*Allium chinense* G. Don) 的干燥鳞茎^[1], 具利水渗湿, 除痹之功效, 用于水肿、癌肿等。

瓜蒌薤白配伍使用源自于张仲景的《金匮要略·胸痹心痛短气病脉证治》篇, 用于胸痹心痛等。课题组前期对瓜蒌薤白配伍抗大鼠心肌缺血-再灌注损伤 (myocardial ischemia reperfusion injury, MIRI) 的药效学进行了研究, 发现瓜蒌薤白配伍可有效抑制 MIRI 大鼠心电图 ST 段的抬高, 降低大鼠肌酸激酶 MB 同工酶、肌红蛋白、心肌肌钙蛋白-T 值 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 改善心肌组织状况, 降低心肌梗死百分率 ($P < 0.01$)^[2]。研究表明心肌细胞凋亡对 MIRI 起主导作用, PI3K/Akt 信号通路可能是调控细胞凋亡最重要的途径之一^[3]。

因此, 本课题采用网络药理学方法^[4, 5], 构建瓜蒌薤白配伍的化学成分-靶点蛋白-信号通路, 探讨瓜蒌薤白配伍的作用机制。在此基础上, 观察瓜蒌薤白滴丸预处理对急性心肌缺血-再灌注损伤大鼠心肌细胞凋亡及凋亡相关信号通路 PI3K/Akt 中蛋白表达的影响, 采用原位末端脱氧核苷酸转移酶标记 (TdT-mediated dUTP nick-end labeling, TUNEL) 法测定心肌细胞凋亡百分率, 蛋白质免疫印迹法测定 Akt、p-Akt 和 caspase-3 蛋白的表达。检测心肌缺血-再灌注损伤对大鼠心肌细胞凋亡及 PI3K/Akt 通路中蛋白表达的影响, 探讨 PI3K 信号通路特异性阻断剂渥曼青霉素 (wortmannin) 对瓜蒌薤白滴丸调控心肌细胞凋亡及蛋白表达的作用, 明确瓜蒌薤白配伍抗心力衰竭的作用机制。

材料与方法

实验动物 SPF 级 Sprague Dawley (SD) 大鼠, 雄性, 体重 180~250 g, 由浙江省实验动物中心提供, 合格证号: SCXK (浙) 2008-0033。

药品与试剂 瓜蒌薤白滴丸 (批号: 20140101, 皖南医学院药学院药物制剂及质量控制课题组提供); 凯基 TUNEL 细胞凋亡原位检测试剂盒 (南京凯基生物科技发展有限公司, KGA7032); 二喹啉甲酸 (bicinchoninic acid, BCA) 蛋白测定试剂盒 (武汉博士德生物工程有限公司, AR0146); 超敏电化学发光 (electro-chemiluminescence, ECL) 试剂盒 BeyoECL Plus (P0018)、caspase-3 抗体 (AC033)、phospho-Akt (Ser473) 抗体 (AA329-1)、Akt 抗体 (AA326)、tubulin 抗体 (AT819)、辣根过氧化物酶 (horseradish peroxidase, HRP) 标记山羊抗兔 IgG (H+L) (A0208)、HRP 标记山羊抗小鼠 IgG (H+L) (A0216)、wortmannin (S1952) (碧云天生物技术研究所)。

仪器 HX-300 小动物呼吸机、BL-420 生物机能采集系统 (成都泰盟软件有限公司); TE70X 型半干转膜仪 (美国 Hoefer); Chemi Scope 3400 化学发光成像系统 (Clinx Science Instruments Co., Ltd); DYY-2C 型电泳仪 (北京六一仪器厂)。

数据库及分析软件 数据库主要包括 TCM Database@Taiwan (<http://tcm.cmu.edu.tw/>)、TCMSP (<http://lsp.nwsuaf.edu.cn/tcmsp.php>)、DRAR-CPI (<http://cpi.bio-x.cn/drar>)、UniProt (<http://www.uniprot.org/>)、CoolGen (<http://ci.smu.edu.cn/CoolGen/Home.php>)、DAVID 数据库 (<https://david.ncifcrf.gov/tools.jsp>); 分析软件主要有 ChemBioDrawUltta 14.0、Gephi0.9.2 软件。

化学成分的筛选 通过检索 TCM Database@

Taiwan、TCMSP 数据库 (检索日期为 2018 年 3 月 18 日), 筛选出符合口服生物利用度 (oral bioavailability, OB) $\geq 30\%$ 、类药性 (drug like, DL) ≥ 0.18 的化合物 21 个。腺苷 (adenosine) 的 OB 为 15.98%, DL 为 0.18, 该化合物为已知瓜蒌薤白中的药效成分^[6], 因此共获得 22 个化合物, 见表 1。所有化合物分子结构式采用 ChemBioDrawUltta 14.0 软件进行绘制, 结果保存为 MDL SDFfile (*.sdf) 文件格式备用。

潜在靶点的预测 登陆 DRAR-CPI 数据库分别上传表 1 中各成分 sdf 格式文件 (数据上传日期为 2018 年 3 月 18 日, 完成日期为 2018 年 4 月 2 日), 选择 Z'-score < -1 筛选蛋白靶点并将 PDB ID 导入 UniProt 数据库, 获得瓜蒌薤白中各成分的基因靶点 (检索日期为 2018 年 4 月 3 日)。

心力衰竭相关的靶标蛋白质的收集 通过 CoolGen 数据库, 以 “heart failure” 为关键词, 搜索 Medline 及 GeneRIF 数据库, 收集与心力衰竭相关的靶点蛋白 (检索日期为 2018 年 4 月 5 日)。

生物功能及靶点通路注释分析 将靶点蛋白复制至 DAVID 数据库的列表中, 选择标示符为 official_gene_symbol, 物种注释为 homo sapiens, 进行 GOTERM_BP_DIRECT 富集分析和 Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG)_PATHWAY 通路注释分析 (检索日期为 2018 年 4 月 6 日)。

成分-蛋白靶点-信号通路网络分析和构建 根据预测结果, 使用 Gephi 软件将筛选出来的活性成分、靶点蛋白和作用通路构建成分-靶点蛋白-信号通路网络。

动物分组及给药 SPF 级 SD 大鼠随机分为 6 组, 每组 6 只, 假手术组、模型组、wortmannin 组分别给予生理盐水, 瓜蒌薤白滴丸组 $22.5 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$, 瓜蒌

薤白滴丸 $22.5 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 和 wortmannin 合用组, 复方丹参滴丸组 $85.05 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, 每天 1 次, 灌胃, 灌胃体积 $3 \text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。造模前 15 min, wortmannin 组及 wortmannin 合用组腹腔注射 wortmannin $15 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$, 其余各组腹腔注射生理盐水, 注射体积 $5 \text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。

MIRI 动物模型制备 将大鼠腹腔注射 10% 水合氯醛 ($3 \text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$) 麻醉, 气管插管, 监测心电图变化, 左冠状动脉结扎 30 min 后解结扎再灌注 120 min。再灌注结束后, 于左心室取血并置于含乙二胺四乙酸二钠抗凝剂的取血管中, 制备血浆置于 $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱, 备用; 同时取心脏并于心尖处分两部分, 分别置于 $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ 冷冻和用 4% 多聚甲醛溶液固定 24~48 h, 备用。

心肌细胞凋亡测定 取出 4% 多聚甲醛固定心脏, 采用 TUNEL 法检测大鼠心肌细胞的凋亡指数。凋亡指数 (apoptosis index, AI), 即心肌细胞凋亡率 = (凋亡心肌细胞数/心肌细胞总数) $\times 100\%$ ^[7]。

心肌组织蛋白提取及 Western blot 法分析 取 $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ 保存的心脏, 称重并匀浆。按心脏重量 (g) : 裂解液 (mL) = 1 : 10 加入 RIPA 裂解液, 混匀, 冰上孵育至完全裂解, $13\,000 \times g$ 离心 5 min, 取上清液即为蛋白样品。用 BCA 蛋白定量试剂盒计算各样品蛋白浓度。用聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白样品, 半干式转膜法转膜, 将转好的 PVDF 膜用 BSA 封闭后进行抗体孵育, 一抗、二抗分别为小鼠抗兔单克隆抗体、HRP 标记的羊抗兔 IgG; ECL 自显影; 凝胶成像系统拍照观察 Akt、p-Akt、caspase-3 蛋白的表达情况^[5]。

统计学分析 应用 SPSS 13.0 软件进行统计分析, 各统计指标以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 两组间比较用 *t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义, $P < 0.01$ 为差异有显著统计学意义。

Table 1 Information on main compounds in Gualou and Xiebai. hydroxyphenyl)ethyl]acrylamide

Mol ID	Compound	Molecular formula	Source	Mol ID	Compound	Molecular formula	Source
MOL007165	10 α -Cucurbita-5,24-diene-3 β -ol	C ₃₀ H ₅₀ O	Gualou	MOL006946	Adenosine	C ₁₀ H ₁₃ N ₅ O ₄	Gualou, Xiebai
MOL007171	5-Dehydrokarounidiol	C ₃₀ H ₄₆ O ₂	Gualou	MOL000358	Beta-sitosterol	C ₂₉ H ₅₀ O	Xiebai
MOL007172	7-oxo-Dihydrokaro-unidiol	C ₃₀ H ₄₈ O ₃	Gualou	MOL000631	Coumaroyltyramine	C ₁₇ H ₁₇ NO ₃	Xiebai
MOL002881	Diosmetin	C ₁₆ H ₁₂ O ₆	Gualou	MOL002341	Hesperetin	C ₁₆ H ₁₄ O ₆	Xiebai
MOL005530	Hydroxygenkwanin	C ₁₆ H ₁₂ O ₆	Gualou	MOL007640	Macrostemonoside	C ₂₇ H ₄₄ O ₃	Xiebai
MOL007179	Linolenic acid ethyl ester	C ₂₀ H ₃₄ O ₂	Gualou	MOL004328	Naringenin	C ₁₅ H ₁₂ O ₅	Xiebai
MOL001494	Mandenol	C ₂₀ H ₃₆ O ₂	Gualou	MOL000332	<i>n</i> -Coumaroyltyramine	C ₁₇ H ₁₇ NO ₃	Xiebai
MOL006756	Schottenol	C ₂₉ H ₅₀ O	Gualou	MOL007650	PGA	C ₂₀ H ₃₂ O ₄	Xiebai
MOL004355	Spinasterol	C ₂₉ H ₄₈ O	Gualou	MOL007651	Prostaglandin B1	C ₂₀ H ₃₂ O ₄	Xiebai
MOL007180	Vitamin-e	C ₂₄ H ₃₄ N ₄ O ₅ S	Gualou	MOL001973	Sitosteryl acetate	C ₃₁ H ₅₂ O ₂	Xiebai
MOL000098	Quercetin	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	Gualou	MOL000483	(Z)-3-Acrylamide	C ₁₉ H ₁₈ NO ₄	Xiebai

(Z)-3-Acrylamide: (Z)-3-(4-Hydroxy-3-methoxy-phenyl)-N-[2-(4-

结果

1 靶点的预测

通过 DRAR-CPI 数据库共得到 324 个靶点蛋白, 其中与 Medline 及 GeneRIF 数据库中心力衰竭相匹配的靶点蛋白有 56 个, 将 56 个靶点蛋白复制至 DAVID 数据库的列表中, 获得 KEGG_PATHWAY 通路注释分析结果, 与 $P < 0.05$ 的注释通路相对应的靶点蛋白有 28 个, 见表 2。

2 靶点生物功能分析

Gene ontology (GO) 生物功能分析是指从生物功能上对基因产物进行标准化描述, 对基因产物进行注释, 通过 GO 富集分析可以了解差异基因富集的生物学功能。将 28 个靶点蛋白复制至 DAVID 数据库的列表中, 获得 GOTERM_BP_DIRECT 富集分析结果, 按 P 值大小排序, 前 20 个 GO 生物功能结果见表 3。生物学过程与激素刺激反应 (response to hormone stimulus)、磷酸化 (phosphorylation) 和细胞凋亡调控 (regulation of apoptosis) 等相关性大。

3 靶点信号通路分析

为进一步明确 28 个靶点蛋白的生物学功能, 通过对信号通路进行富集分析, 可知与心力衰竭相关的通路, 包括胰岛素信号通路 (insulin signaling pathway)、MAPK 信号通路 (MAPK signaling pathway)、细胞凋亡 (apoptosis) 等, $P < 0.05$ 的信号通路富集结果, 见表 4。

4 活性成分-靶点蛋白-信号通路网络分析和构建

使用 Gephi 软件将筛选出来的 22 个瓜蒌薤白中的活性成分、28 个靶点蛋白和 22 条信号通路构建活性成分-靶点蛋白-信号通路网络 (图 1)。瓜蒌薤白中的活性成分和靶点蛋白、作用通路间存在复杂的网络关系, 瓜蒌薤白中活性成分可作用于不同的靶点蛋白, 借助不同的信号通路发挥作用。

在各信号途径中, PI3K/Akt 信号通路参与多个信号途径, 如细胞凋亡、趋化因子信号通路、结肠直肠癌、子宫内膜癌、ErbB 信号通路、Fc- ϵ 受体 RI 信号通路、黏着斑、胶质瘤、胰岛素信号通路、黑色素

Table 2 Main potential target information related to heart failure in Gualou and Xiebai

No.	PDBID	Protein number	Target name	Protein class
1	2BIY	O15530	PDPK1	Phosphoinositide-dependent protein kinase 1
2	1NSI	P35228	NOS2	Nitric oxide synthase, inducible
3	1UKI	P45983	MAPK8	Mitogen-activated protein kinase 8
4	1ZEO	P37231	PPARG	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma
5	2GU8	P17612	PRKACA	cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit alpha
6	1A9U	Q16539	MAPK14	Mitogen-activated protein kinase 14
7	1FT4	P19438	1FT4	Tumor necrosis factor receptor superfamily member 1A
8	1F3M	Q13153	PAK1	Serine/threonine-protein kinase PAK 1
9	1TVO	P28482	MAPK1	Mitogen-activated protein kinase 1
10	2AUH	P06213	INSR	Insulin receptor
11	2CYK	P05112	IL4	Interleukin-4
12	1G0Y	P14778	IL1R1	Interleukin-1 receptor type I
13	1GMN	P14210	HGF	Hepatocyte growth factor
14	11GS	P09211	GSTP1	Glutathione S-transferase P
15	1R0E	P49841	GSK3B	Glycogen synthase kinase-3 beta
16	1GFW	P42574	CASP3	Caspase-3
17	1CTR	P0DP23	CALM1	Calmodulin
18	3CQW	P31749	AKT1	RAC-alpha serine/threonine-protein kinase
19	1OPL	P00519	ABL1	Proto-oncogene tyrosine-protein kinase ABL1
20	2ILK	P22301	IL10	Interleukin-10
21	2Z5X	P21397	MAOA	Amine oxidase [flavin-containing] A
22	3JDW	P50440	GATM	Glycine amidinotransferase, mitochondrial
3	1B2T	P78423	CX3CL1	Fractalkine
24	1ICE	P29466	CASP1	Caspase-1
25	1H0C	P21549	AGXT	Serine--pyruvate aminotransferase
26	2G1N	P00797	REN	Renin
27	1R4L	Q9BYF1	ACE2	Angiotensin-converting enzyme 2
28	1CGH	P08311	CTSG	Cathepsin G

Table 3 GO biological process enrichment analysis of potential targets of active ingredients in Gualou and Xiebai

No.	ID	GO functional annotation	Target number	P-value
1	GO:0009725	Response to hormone stimulus	10	2.19e-8
2	GO:0007243	Protein kinase cascade	10	2.35e-8
3	GO:0009719	Response to endogenous stimulus	10	5.14e-8
4	GO:0007242	Intracellular signaling cascade	14	2.07e-7
5	GO:0006468	Protein amino acid phosphorylation	11	3.12e-7
6	GO:0044093	Positive regulation of molecular function	10	1.17e-6
7	GO:0016310	Phosphorylation	11	1.65e-6
8	GO:0042981	Regulation of apoptosis	11	1.73e-6
9	GO:0043067	Regulation of programmed cell death	11	1.90e-6
10	GO:0010941	Regulation of cell death	11	1.96e-6
11	GO:0070201	Regulation of establishment of protein localization	6	3.63e-6
12	GO:0043066	Negative regulation of apoptosis	8	4.47e-6
13	GO:0043069	Negative regulation of programmed cell death	8	4.90e-6
14	GO:0060548	Negative regulation of cell death	8	5.00e-6
15	GO:0051338	Regulation of transferase activity	8	6.20e-6
16	GO:0032880	Regulation of protein localization	6	6.92e-6
17	GO:0010627	Regulation of protein kinase cascade	7	7.83e-6
18	GO:0006796	Phosphate metabolic process	11	9.64e-6
19	GO:0043434	Response to peptide hormone stimulus	6	1.18e-5
20	GO:0050727	Regulation of inflammatory response	5	1.46e-5

Table 4 KEGG signaling pathway enrichment analysis of potential anti-heart failure targets in Gualou and Xiebai

No.	ID	Pathway	Target number	P-value
1	hsa04910	Insulin signaling pathway	8	5.04e-5
2	hsa04660	T cell receptor signaling pathway	7	1.29e-4
3	hsa04722	Neurotrophin signaling pathway	7	2.71e-4
4	hsa04012	ErbB signaling pathway	6	4.20e-4
5	hsa05200	Pathways in cancer	10	5.31e-4
6	hsa04010	MAPK signaling pathway	9	6.41e-4
7	hsa04664	Fc epsilon RI signaling pathway	5	0.00254
8	hsa05210	Colorectal cancer	5	0.00333
9	hsa04510	Focal adhesion	7	0.00339
10	hsa04914	Apoptosis	5	0.00378
11	hsa05215	Prostate cancer	5	0.00411
12	hsa04912	GnRH signaling pathway	5	0.00579
13	hsa05213	Endometrial cancer	4	0.00661
14	hsa04614	Renin-angiotensin system	3	0.00689
15	hsa05014	Amyotrophic lateral sclerosis (ALS)	4	0.00697
16	hsa04621	NOD-like receptor signaling pathway	4	0.0107
17	hsa04062	Chemokine signaling pathway	6	0.0119
18	hsa05211	Renal cell carcinoma	4	0.0149
19	hsa00260	Glycine, serine and threonine metabolism	3	0.0221
20	hsa04960	Aldosterone-regulated sodium reabsorption	3	0.0371
21	hsa04620	Toll-like receptor signaling pathway	4	0.0388
22	hsa04930	Type II diabetes mellitus	3	0.0476

瘤、mTOR 信号通路、神经营养信号通路、非小细胞肺癌、癌症通路、孕酮介导的卵母细胞成熟、前列腺癌、T 细胞受体信号通路、Toll 样受体信号通路等。为此,选择细胞凋亡途径中的 PI3K/Akt 信号通路进行生物学验证,考察瓜蒌薤白滴丸预处理对心肌缺

血-再灌注损伤大鼠心肌细胞凋亡及凋亡相关信号通路 PI3K/Akt 中蛋白表达的影响。

5 瓜蒌薤白滴丸对大鼠心肌缺血再灌注心肌组织细胞凋亡的影响

按心肌细胞凋亡测定方法处理,检测大鼠心肌

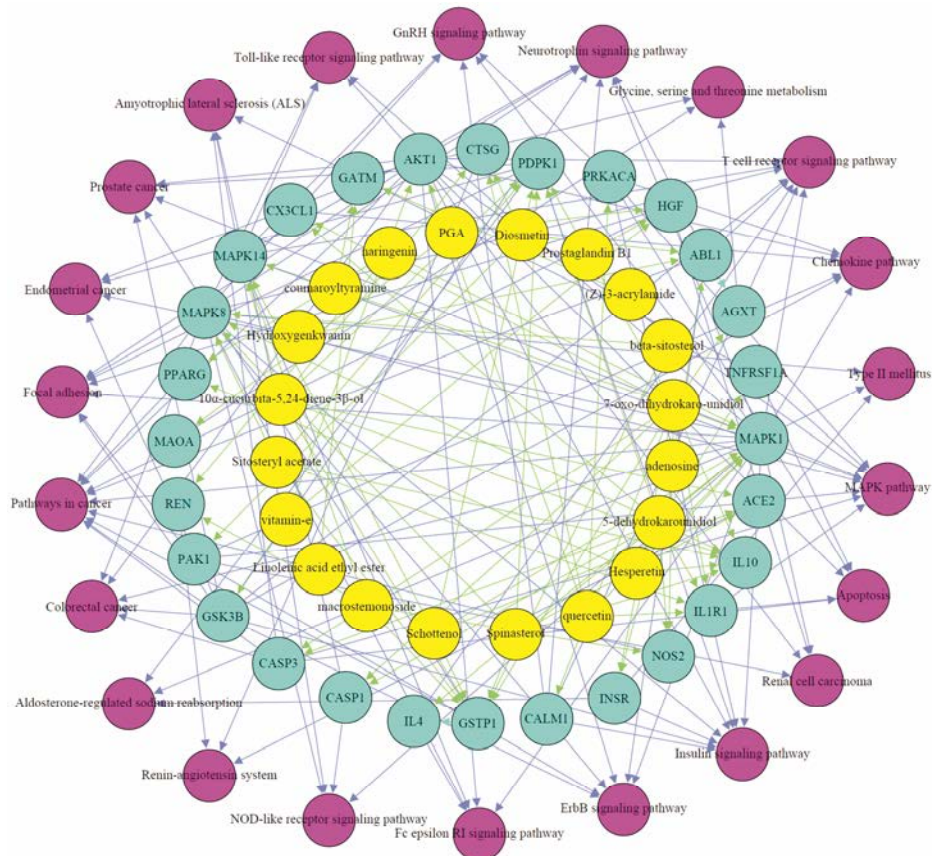


Figure 1 Compounds (●)-target protein (●)-pathways (●) network

细胞的凋亡指数。结果见图 2。统计各组凋亡指数, 结果见表 5。

与模型组比较, wortmannin 组心肌细胞凋亡指数差异无统计学意义, 瓜蒌薤白滴丸心肌细胞凋亡指数显著减少 ($P < 0.01$); 与瓜蒌薤白滴丸组比较, 瓜蒌薤白滴丸与 wortmannin 合用组心肌细胞凋亡指数增加 ($P < 0.01$)。

Table 5 Compare of each group myocardial apoptotic index. $n = 6$, $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$ vs model group; # $P < 0.05$ vs Gualou Xiebai dropping pills group

Group	Apoptosis rate/%
Model group	35.74 ± 2.77
Gualou-Xiebai dropping pills group	22.71 ± 1.53*
Wortmannin group	36.81 ± 2.53#
Gualou-Xiebai dropping pills + wortmannin group	28.17 ± 2.35#
Compound Danshen dropping pills group	18.87 ± 1.21*

6 瓜蒌薤白滴丸对大鼠缺血再灌注心肌 PI3K/Akt 信号通路影响

观察各组大鼠心肌缺血再灌注后 caspase-3、Akt、p-Akt 表达 (图 3), 与假手术组比较, 模型组 caspase-3 的活性明显升高 ($P < 0.05$), 提示造模成功;

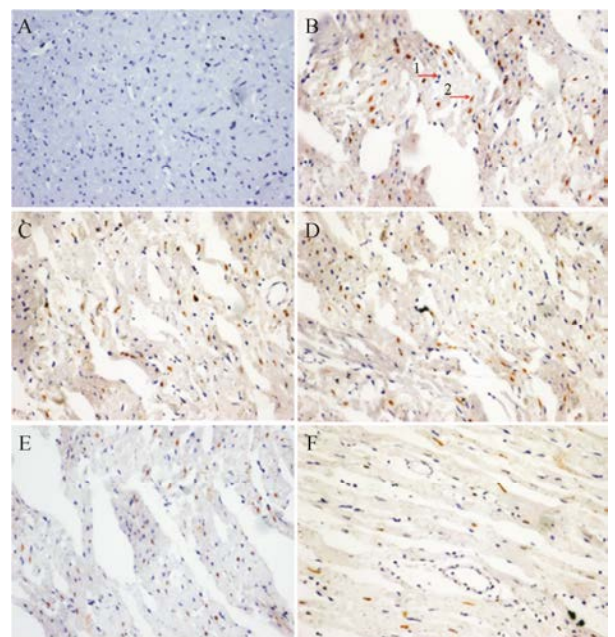


Figure 2 Stained sections of Gualou Xiebai dropping pills against myocardial apoptosis induced by ischemia and reperfusion injury in rats ($\times 200$). A: Sham operation group; B: Model group; C: Gualou-Xiebai dropping pills group; D: Wortmannin group; E: Gualou-Xiebai dropping pills + wortmannin group; F: Compound Danshen dropping pills group; 1: Normal cells; 2: Apoptotic cells

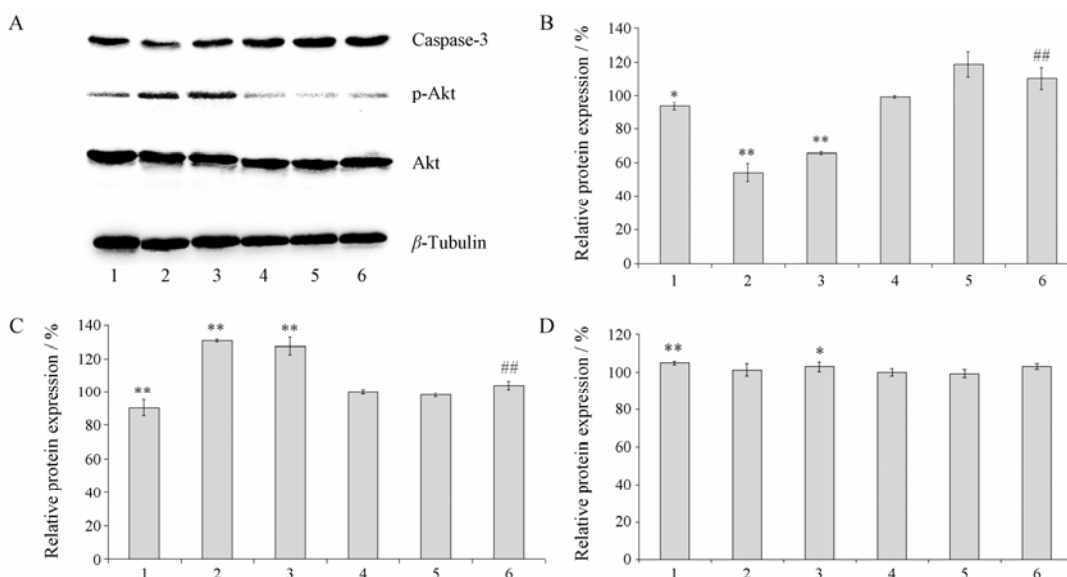


Figure 3 The protein expressions of caspase-3, p-Akt and Akt were determined by Western blot analysis (A). The protein expression of caspase-3 (B), p-Akt (C) and Akt (D) relative to β -tubulin. 1: Sham operation group; 2: Gualou-Xiebai dropping pills group; 3: Compound Danshen dropping pills group; 4: Model group; 5: Wortmannin group; 6: Gualou-Xiebai dropping pills + wortmannin group. $n=6$, $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs model group; ## $P < 0.01$ vs Gualou Xiebai dropping pills group

与模型组比较, wortmannin 组 caspase-3 和 p-Akt/Akt 表达无明显差异, 说明 wortmannin 对 caspase-3、Akt、p-Akt 表达的影响可忽略; 与模型组比较, 瓜蒌薤白滴丸组能显著抑制 caspase-3 的活性 ($P < 0.01$), 激活 PI3K/Akt 磷酸化过程, 上调 p-Akt 蛋白表达水平; 与瓜蒌薤白滴丸组比较, 瓜蒌薤白滴丸与 wortmannin 合用组 p-Akt/Akt 值显著减小 ($P < 0.01$), 提示 wortmannin 能阻断 Akt 蛋白的磷酸化过程, 抑制 PI3K/Akt 信号通路的激活, 促进细胞凋亡。

讨论

本研究借助 DRAR-CPI 及 DAVID 等数据库, 对瓜蒌薤白中 22 个化合物进行网络药理学分析, 发现 10 α -cucurbita-5,24-diene-3 β -ol 和 macrostemonoside 等 22 个化合物通过多靶点、多生物途径及多通路方式协同抗心力衰竭, 涉及激素刺激反应、磷酸化、细胞凋亡调控等生物学途径和胰岛素、MAPK、细胞凋亡等信号通路, 部分功能已有文献报道, 如瓜蒌薤白通过 3 种 MAPKs 信号通路参与抗大鼠急性心肌缺血所致的心肌损伤^[8]; 瓜蒌薤白煎液通过抑制大鼠被激活的 p38、c-Jun 氨基末端激酶信号通路, 降低心肌损伤, 磷酸化过程有着重要的作用^[9]; 此外, 瓜蒌薤白汤通过下调 Fas/Fas-L 的表达对抗异丙肾上腺素诱导的心肌细胞凋亡^[10]; 通过小鼠离体 MIRI 模型实验证明, 瓜蒌薤白白酒汤可通过促进 Akt/糖原合成酶激酶-3 β 磷酸化、增加 Bcl-2/Bax 比值、下调 cleaved-caspase-3

表达而抑制心肌细胞凋亡等^[11]。

细胞凋亡是心肌缺血再灌注损伤的主要细胞死亡形式, 有多种基因参与。通过本文网络药理学研究可知, 瓜蒌薤白中 5-dehydrokarounidiol、7-oxo-dihydrokaro-unidiol、quercetin (来自瓜蒌) 及 sitosteryl acetate (来自薤白) 4 种成分通过调控 Akt1、TNFRSF1A、IL1R1、CASP3 和 PRKACA 等基因参与细胞凋亡过程。其中 caspase-3 (CASP3) 是半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶家族中最重要的成员之一, 是细胞凋亡及级联反应的必经之路^[12]。PI3K/Akt 信号通路是抑制细胞凋亡的重要信号通路^[13], Akt 的磷酸化程度非常关键^[14], 活化的 Akt 可激活下游靶点, 抑制 CASP3 导致的细胞凋亡^[15]。特异性信号通路阻断剂 wortmannin 可抑制 PI3K/Akt 的磷酸化过程。

本实验结果显示, 与模型组相比, wortmannin 对心肌细胞凋亡水平的影响无统计学意义, 瓜蒌薤白滴丸组可降低心肌细胞凋亡指数 ($P < 0.01$)。与瓜蒌薤白滴丸组相比, 瓜蒌薤白滴丸与 wortmannin 合用组凋亡指数增加 ($P < 0.01$), 说明 wortmannin 能抑制瓜蒌薤白滴丸抗心肌细胞凋亡作用。瓜蒌薤白滴丸能有效抑制大鼠急性心肌缺血-再灌注损伤时心肌中 CASP3 蛋白的表达, 促进 Akt 蛋白的磷酸化。综上, 瓜蒌薤白配伍可通过细胞凋亡调控和磷酸化等生物学途径发挥抗心力衰竭作用, 进一步验证了网络药理学的预测结果, 对于下一步深入研究瓜蒌薤白配伍抗心力衰竭的作用机制具有重要意义。

References

- [1] China Pharmacopoeia Committee. Chinese Pharmacopoeia Vol I (中国药典.一部) [S]. Beijing: China Medical Science Press, 2015: 112, 376.
- [2] Zou CC, Wei ML, Yan HY, et al. Effects of Gualou Xiebai dropping pills against myocardial ischemia reperfusion injury [J]. J Int Pharm Res (国际药学研究杂志), 2016, 43: 926–930.
- [3] Li XD, Yang YJ, Geng YJ, et al. Phosphorylation of endothelial NOS contributes to simvastatin protection against myocardial no-reflow and infarction in reperfused swine hearts: partially *via* the PKA signaling pathway [J]. Acta Pharmacol Sin, 2012, 33: 879–887.
- [4] Wu D, Gao Y, Xiang H, et al. Exploration into mechanism of antidepressant of Bupleuri radix based on network pharmacology [J]. Acta Pharm Sin (药学学报), 2018, 53: 210–219.
- [5] Sun LM, Liu LF, Zhu HX, et al. Network pharmacology-based study on intervention mechanism of Huanglian Jiedu decoction in the treatment of Alzheimer's disease [J]. Acta Pharm Sin (药学学报), 2017, 52: 1268–1275.
- [6] Liu DL, Qu GX, Wang NL, et al. Anti-platelet aggregation constituents from *Trichosanthes kirilowii* [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2004, 35: 1334–1336.
- [7] Wei ML. Effects and Mechanism of Gualou Xiebai Dropping Pills on Myocardial Ischemia Reperfusion Injury Rats (瓜蒌薤白滴丸抗心肌缺血-再灌注损伤的作用及相关机制研究) [D]. Wuhu: Wannan Medical College: 2016.
- [8] Yan BW. Protective Effects of *Trichosanthes Kirilowii* Maxim and *Allium Macrostemon* Bge on Chronic Myocardial Ischemia (“瓜蒌-薤白”对慢性心肌缺血保护作用的研究) [D]. Wuhan: Hubei University of Chinese Medicine: 2013.
- [9] Lei Y. Study on Protective Effect of *Trichosanthes Kirilowii* Maxim and *Allium Macrostemon* Bge on Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury in Rat (“瓜蒌-薤白”药对大鼠抗急性心肌缺血的保护作用的研究) [D]. Wuhan: Hubei University of Chinese Medicine: 2013.
- [10] Ding YF, Peng YR, Shen MQ, et al. Effects of Gua Lou Xie Bai Decoction on cardiomyocyte apoptosis and apoptosis regulation gene expression [J]. J Med Mater (中药材), 2011, 34: 1922–1925.
- [11] Cheng J, Huang L, Kong CC, et al. Gualou Xiebai Baijiu Decoction alleviates myocardial ischemia reperfusion injury *via* Akt/GSK-3 β signaling pathway [J]. J Shanghai Univ Tradit Chin Med (上海中医药大学学报), 2018, 32: 82–85.
- [12] Fan Y, Bergmann A. The cleaved-caspase-3 antibody is a marker of caspase-9-like DRONC activity in *Drosophila* [J]. Cell Death Differ, 2010, 17: 534–539.
- [13] Hausenloy DJ, Yellon DM. New directions for protecting the heart against ischaemia-reperfusion injury: targeting the reperfusion injury salvage kinase (RISK)-pathway [J]. Cardiovasc Res, 2004, 61: 448–460.
- [14] McGuire VA, Gray A, Monk CE, et al. Cross talk between the Akt and p38 α pathways in macrophages downstream of toll-like receptor signaling [J]. Mol Cell Biol, 2013, 33: 4152–4165.
- [15] Sussman MA, Völkers M, Fischer K, et al. Myocardial Akt: the omnipresent nexus [J]. Physiol Rev, 2011, 91: 1023–1070.