

基于代谢组学和网络药理学方法探讨芪参益气滴丸改善心衰大鼠心脏能量代谢的作用机制

吕雪琪, 郭聪聪, 许悦, 靳香菊, 王映红*

(中国医学科学院、北京协和医学院药物研究所, 天然药物活性物质与功能国家重点实验室, 北京 100050)

摘要: 组学与生物信息学为中药机制研究带来了新的思路。本研究采用代谢组学和网络药理学联合策略探讨芪参益气滴丸 (Qishen Yiqi dropping pill, QDP) 改善心力衰竭 (heart failure, HF) 大鼠心脏能量代谢的药效物质基础及网络调控机制。¹H NMR 代谢组学分析从 HF 大鼠心脏组织中发现肉碱、谷氨酰胺、肌酸、脯氨酸、高瓜氨酸、乳酸、牛磺酸和丙氨酸等 8 个代谢物在 QDP 治疗后显著回调, 表明 QDP 调控糖、脂、ATP 和蛋白质代谢等过程。动物实验操作均遵循中国医学科学院药物研究所实验动物管理与动物福利伦理委员会的规定。利用网络药理学建立“药物-成分-靶点-疾病”网络, 并结合代谢组学结果提取与上述代谢过程相关的“成分-靶点”子网络, 显示了 QDP 调节能量代谢潜在的 47 个作用靶点和 79 个化学成分, 提炼了熊果酸、三七皂苷、人参皂苷等关键化学成分与 INS、PPARG、AKT1 等核心靶点, 同时也从能量代谢的角度展示了 QDP 与 HF 之间多靶点、多成分的复杂作用关系。分子对接技术验证了部分靶点与化学成分良好的相互作用, 其结合能均小于 $-5 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ 。本研究结果为 QDP 临床应用及方剂开发利用提供了有用信息。

关键词: 芪参益气滴丸; 心力衰竭; 代谢组学; 网络药理学; 分子对接

中图分类号: R966 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2022)05-1387-09

A proposed mechanism by which Qishen Yiqi dropping pill improves cardiac energy metabolism in rats with heart failure based on metabolomics and network pharmacology

LÜ Xue-qi, GUO Cong-cong, XU Yue, JIN Xiang-ju, WANG Ying-hong*

(State Key Laboratory of Bioactive Substances and Functions of Natural Medicines, Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China)

Abstract: "Omics" and bioinformatics have brought new ideas to the study of traditional Chinese medicine. This study used metabolomics and network pharmacology to investigate the pharmacodynamic basis and regulation of Qishen Yiqi dropping pill (QDP) improving cardiac energy metabolism in rats with heart failure (HF). ¹H NMR metabolomics analysis showed that eight metabolites, including carnitine, glutamine, creatine, proline, homocitrulline, lactic acid, taurine and alanine appeared significant callback after QDP treatment for HF. The results indicate that QDP regulates the metabolism of carbohydrate, lipid, ATP and protein. The animal experiment was conducted in accordance with the regulations of the Ethics Committee for Experimental Animal Management and Animal Welfare of Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences. A "drug-component-target-disease" network was established using network pharmacology, and the "component-target" sub-network related to the above energy metabolism processes was extracted by combining metabolomics results. Results

收稿日期: 2022-01-18; 修回日期: 2022-03-22.

基金项目: 国家科技重大专项项目 (2018ZX09711001-002-004); 中国医学科学院医学与健康科技创新工程项目 (2016-I2M-1-009).

*通讯作者 Tel: 86-10-63165216, E-mail: wyh@imm.ac.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2022-0092

revealed 79 chemical compounds and 47 potential targets of QDP involved in the regulation of energy metabolism, and identified key chemical components including ursolic acid, notoginsenoside G, ginsenoside-Rh1, and core targets such as INS, PPARG, and AKT1. The results also demonstrated the complex multi-target and multi-component relationship between QDP and HF from the perspective of energy metabolism. The molecular docking technique verified a strong interaction between some targets and chemical compounds, with affinities less than $-5 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$. The results of this study provide useful information for the clinical application, development, and utilization of QDP.

Key words: Qishen Yiqi dropping pill; heart failure; metabonomics; network pharmacology; molecular docking

心力衰竭 (heart failure, HF) 是各种心血管事件的最终结果和各种心脏异常的累积效应^[1]。HF 发生时心肌收缩力减弱, 心功能及血流动力学等多项参数均发生改变, 如左心室射血分数 (left ventricular ejection fractions, LVEF)、短轴缩短率 (fractional shortening, FS)、心输出量 (cardiac output, CO) 等^[2], 可导致相当高的发病率和死亡率^[3]。近年来, 临床广泛使用利尿剂、血管扩张剂、正性肌力药、醛固酮受体拮抗剂等西药治疗 HF^[4], 但这些治疗模式为单一靶点的西药, 未能针对 HF 复杂的病理机制发挥治疗效果, 不能缓解长期缺血缺氧导致的微循环变化。中药具有多成分、多靶点的特点, 对 HF 等复杂心血管疾病具有良好的治疗或辅助治疗效果。

临床研究显示^[4,5], 芪参益气滴丸 (Qishen Yiqi dropping pill, QDP) 用于 HF 的防治具有显著疗效, 且不良反应少。QDP 是一种复方中药, 2003 年被国家食品药品监督管理局批准用于治疗心功能障碍。QDP 主要包含黄芪、丹参、三七、降香 4 味中药, 具有复杂化学组成成分和多靶点, 因此, 其药效物质基础与药效及作用机制间难以建立良好的对应关系, 这阻碍了 QDP 的进一步应用与国际化进程。

有研究报道^[6], 在 HF 病理状态下, 心脏的能量代谢失衡, 能量利用是判断心脏功能的重要依据。前期研究^[7]表明 QDP 可调节能量代谢对心肌梗死大鼠起保护作用, 然而支持 QDP 调节能量代谢的作用机制及背后的物质基础不明确。

QDP 和 HF 之间的相互作用是系统到系统的非线性、复杂作用模式。因此, 采用组学和生物信息学的研究策略有助于揭示 QDP 对 HF 的整体调控机制。代谢组学作为系统生物学的重要组成部分^[8], 研究机体小分子代谢物, 已被广泛用于探究代谢标志物与热点代谢途径。网络药理学^[9]将中药成分与疾病靶点联系起来, 能够从改善或恢复生物网络平衡的整体观角度认识药物与机体相互作用。近年来, 分子对接常用于对网络药理学研究建立的活性成分与靶点关系进行初步理论验证, 是计算机辅助药物研究领域的一项重要技

术^[10]。本研究采用代谢组学和网络药理学联合方式研究 QDP 干预对 HF 大鼠心脏组织能量代谢的影响, 并初步探讨 QDP 治疗 HF 对能量代谢调节所涉及的相关药效物质基础、靶点及作用关系。

材料与方法

主要材料 羧甲基纤维素钠 (carboxymethyl cellulose sodium, CMC-Na, 批号: F20170810) 购自国药集团化学试剂有限公司; 芪参益气滴丸 (批号: 国药准字 Z20030139) 购自天士力医药集团股份有限公司; 缬沙坦 (批号: 国药准字 H20040217) 购自北京诺华制药有限公司; 甲醇 (分析纯, 批号: 20211028)、氯仿 (分析纯, 批号: 20191028) 均购自北京市通广精细化工公司; 重水 (deuterium oxide, D₂O) 由 Sigma-Aldrich 生产, 购自北京金鸥翔科贸有限公司; 2,2-二甲基-2-硅氧烷-5-磺酸钠 (sodium 2, 2-dimethyl-2-silapentane-5-sulfonate, DSS, 批号: 1-15369) 购于青岛腾龙微波有限公司。

实验动物 32 只雄性 SD 大鼠购于北京维通利华实验动物技术有限公司 [合格证号: SCXK (京) 2016-0006], 饲养于中国医学科学院药物研究所动物实验中心屏障环境设施中。

实验仪器 多用途低温高速离心机 (型号: 3K15), 德国 Sigma 公司; Bead Ruptor 多样品研磨珠均质仪, 美国 Omni Intenational 公司; Bruker AVANCE III-500 超导傅里叶变化核磁共振波谱仪, 瑞士布鲁克公司; 天平 (型号: BT124S), 德国赛多利斯公司; 冷冻干燥机 (型号: FDU-1110), 日本东京理化器械 (株) 独资工厂。

动物实验 运用左冠前降支结扎法建立心梗后心衰大鼠模型。在造模 2 周后进行超声检查, 判断造模是否成功, 共获得 8 只假手术处理大鼠与 24 只心衰模型大鼠。32 只大鼠分为假手术组 (S)、模型组 (M)、芪参益气滴丸给药组 (QDP) 和缬沙坦给药组 (V), 给药方案如下: S 组灌胃给予等体积对照溶剂 (2.5% CMC-Na); M 组灌胃给予等体积对照溶剂 (2.5% CMC-Na); QDP 组灌胃给予 QDP 剂量为 $270 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{day}^{-1}$ ^[11]; V 组灌胃给予缬沙坦剂量为 $30 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{day}^{-1}$ ^[12]。给药 4 周后超

声检测各组大鼠的心脏功能, 观察给药治疗的效果。动物实验操作均遵循中国医学科学院药物研究所实验动物管理与动物福利伦理委员会的规定。

基于¹H NMR技术的大鼠心脏代谢组学实验 取大鼠心脏结扎附近区域与结扎部位远端(靠心尖部位)心脏组织各150 mg分别进行代谢组学实验, 制备的样品在Bruker AVANCE III-500 MHz谱仪上进行检测, 具体实验步骤参考文献^[13]。¹H NMR谱图采集与参数及数据处理步骤参考文献^[14]。

QDP化学成分与靶点的筛选 将黄芪、丹参、三七和降香4味中药输入TCMIP数据库(<http://www.tcmip.cn/>)^[15]中, 通过TCMIP中药材数据库和中药成分数据库挖掘QDP中4味中药的化学成分及其对应靶点, 将靶点导入David数据库中, 筛选与糖、脂、ATP、蛋白质等代谢相关通路的靶点。

HF相关靶点筛选 以“heart failure”作为检索词, 分别在DisGeNet数据库(<http://www.disgenet.org/>)、GeneCards数据库(<http://www.genecards.org/>)和OMIM数据库(<http://www.omim.org/>)检索与HF相关的靶蛋白。对上述3个数据库中检索到的靶蛋白进行筛选、汇总、去重后, 得到HF相关靶蛋白。

“药物-成分-靶点-疾病”网络的构建与分析 将QDP中化学成分所对应的靶点与HF相关靶点进行对比, 筛选出交集靶点, 作为QDP治疗HF的潜在作用靶点。将中药、潜在作用靶点及其对应的化学成分和疾病之间的两两关系信息导入Cytoscape3.7.1软件中, 构建QDP治疗HF潜在的“中药-成分-靶点-疾病”网络。对该网络进行拓扑分析, 依据分析结果中的degree项筛选QDP治疗HF的关键化学成分。将网络中靶点导入David数据库中, 筛选与糖、脂、ATP、蛋白质等代谢相关通路的靶点, 提取这些靶点与其对应化学成分组成的“成分-靶点”子网络。

蛋白相互作用网络的构建与分析 为明确QDP治疗HF潜在作用靶点在蛋白水平上的相互作用关系, 挖掘关键作用靶点, 构建了蛋白相互作用网络。将潜在作用靶点导入String数据库(<http://string-db.org/>)

中, Organism设为Homo sapiens, Minimum required interaction score设为0.4, 构建靶蛋白相互作用网络。利用CytoHubba挖掘蛋白相互作用网络中的关键靶点, 选用MCC算法; 应用Cytoscape的另一插件MCODE在蛋白相互作用网络中进行聚类构建功能模块。为进一步探讨功能模块潜在的生物学意义, 使用R包对每个模块中包含的靶点集分别进行GO和KEGG的富集分析, 筛选与糖、脂、ATP、蛋白质等代谢相关的生物学过程和信号通路。

化学成分-靶点分子对接 对“中药-成分-靶点-疾病”网络中的关键化学成分与核心靶点, 与糖、脂、ATP、蛋白质等代谢相关的“成分-靶点”对应关系中的部分化学成分与靶点进行分子对接验证。于RCSB PDB蛋白质数据库(<https://www.rcsb.org/>)查找并下载靶点蛋白的3D结构, 于PubChem数据库(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)和SciFinder数据库(<https://scifinder-n.cas.org/>)查找并下载化学成分的3D结构。利用AutoDockTools-1.5.6软件对靶点和化学成分进行去水、加氢等处理并将文件转换为PDBQT格式, 应用AutoDock Vina软件对筛选得到的化学成分与靶点进行分子对接, 以结合能(affinity)指标评价二者之间的亲和力。

统计学分析 数据采用单因素方差分析。所有数值均以means ± SD或SEM表示, $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

结果

1 QDP对心衰大鼠的治疗作用

给药QDP(270 mg·kg⁻¹·day⁻¹)、缬沙坦(30 mg·kg⁻¹·day⁻¹)治疗HF大鼠, 观察其对模型动物心脏功能的影响。结果如图1所示, 给药前与S组相比, 模型动物出现明显心力衰竭症状, 模型动物心脏LVEF、FS显著低于S组, 并且给药前M组与QDP组、V组均未见明显差异, 表明成功建立心衰模型。连续灌胃给药4周后, M组LVEF、FS和CO显著低于S组; 与M组相比, QDP组与V组大鼠心脏LVEF、FS、CO显著回升, 显示QDP有效

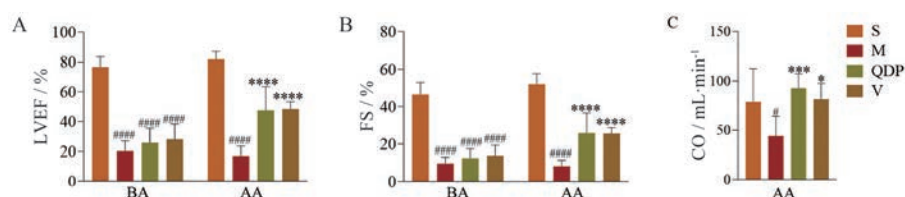


Figure 1 Echocardiographic determination of cardiac function, as assessed by left ventricular ejection fraction (LVEF, A), fractional shortening (FS, B) and cardiac output (CO, C). S: Sham group; M: Model group; QDP: QDP-treated group (270 mg·kg⁻¹·day⁻¹); V: Valsartan-treated group (30 mg·kg⁻¹·day⁻¹); BA: Before administration; AA: After administration. $n = 8$, $\bar{x} \pm s$. # $P < 0.05$, ##### $P < 0.0001$ vs S group; * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$ vs M group

地改善 HF 大鼠心脏功能。

2 HF 和 QDP 对大鼠心脏代谢物的影响

主成分分析 (principal component analysis, PCA) 结果显示, 在结扎附近区域给药组与模型组心脏组织样本代谢轮廓未显著分离, 而结扎部位远端心脏组织样本的代谢轮廓在组间具有显著差异, 给药组由模型组向假手术组回归。偏最小二乘法判别分析 (partial least squares discriminant analysis, PLS-DA) 结果显示 (图2), 结扎部位远端组织 S 组与 M 组、M 组与 QDP 组代谢轮廓可显著分离 (R^2 和 Q^2 均 > 0.5 且 $P < 0.05$)。

结扎部位远端组织主要差异代谢物和代谢通路结果如图3和表1所示, VIP > 1 且 $P < 0.05$ 的相应变量被选择为主要差异代谢物。与 S 组相比, M 组中与

ATP 代谢相关的肌苷和肌酸、糖酵解通路中的乳酸和丙氨酸及与脂肪酸代谢相关的肉碱水平均显著下降, 而缬氨酸、谷氨酸、脯氨酸等显著升高, 这些差异代谢物主要富集通路包括丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢, 精氨酸和脯氨酸代谢、丙酮酸代谢及糖酵解/糖异生等, 显示 M 组大鼠心脏结扎部位远端组织发生糖、脂质、ATP 和蛋白质等代谢紊乱; 与 M 组相比, QDP 组中部分代谢物显著回调, 包括脯氨酸、牛磺酸、肌酸、谷氨酰胺、乳酸、肉碱、丙氨酸等, 这些差异代谢物富集通路主要包括丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢, 精氨酸和脯氨酸代谢及糖酵解/糖异生等, 提示 QDP 可影响糖、脂质、ATP 和蛋白质代谢, 缓解部分能量代谢紊乱。

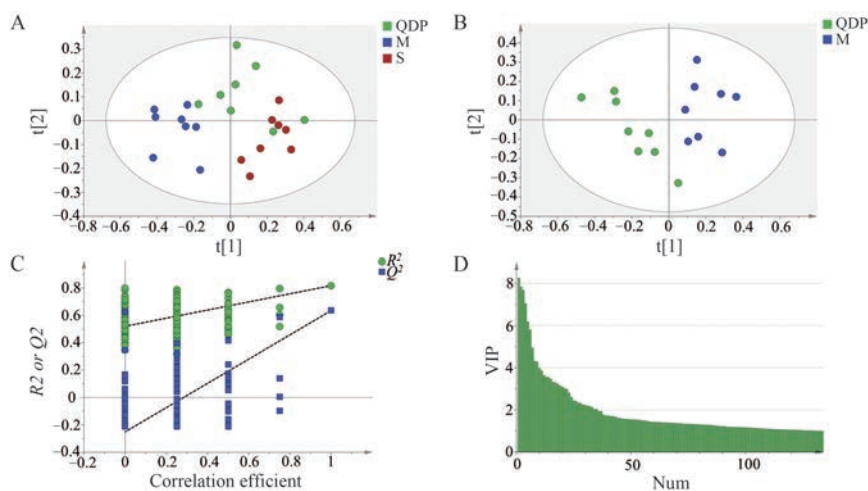


Figure 2 Multivariate analysis of NMR metabolomics data ($n = 8$). A: PLS-DA score plot of S, M and QDP, $R^2X = 0.547$, $R^2Y = 0.922$, $Q^2 = 0.835$; B: PLS-DA score plot of M and QDP, $R^2X = 0.51$, $R^2Y = 0.817$, $Q^2 = 0.635$; C: PLS-DA model verification of M and QDP; D: VIP value of variable in OPLS-DA model of M and QDP

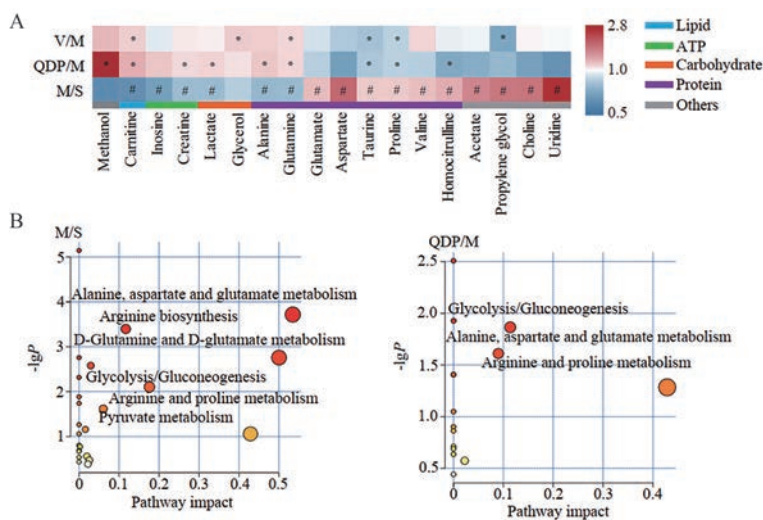


Figure 3 Results of metabolomics analysis of rat heart tissue. A: Differential metabolites in heart samples between S, M, QDP and V groups. The red cells indicate increase in metabolite levels, whereas the blue cells indicate decrease in metabolite levels ($P < 0.05$ and $VIP > 1$, $n = 8$); B: Metabolic pathway changes of heart samples between S, M and QDP groups. # $P < 0.05$ vs S group; * $P < 0.05$ vs M group

Table 1 Differential metabolites in heart samples between S, M, QDP and V groups ($n = 8$). FC: Fold change value. FC with P value < 0.05 is marked by *

Metabolite	M/S		QDP/M		V/M	
	FC	P value	FC	P value	FC	P value
Methanol	0.63	0.247 3	2.79*	0.010 6	1.30	0.508 8
Carnitine	0.65*	0.000 0	1.35*	0.004 3	1.18*	0.049 6
Inosine	0.72*	0.009 2	1.22	0.260 3	0.96	0.820 6
Creatine	0.84*	0.001 6	1.13*	0.036 8	1.07	0.274 6
Lactate	0.83*	0.009 8	1.16*	0.037 8	1.05	0.546 0
Glycerol	0.89	0.216 0	1.10	0.385 9	1.19*	0.031 3
Alanine	0.82*	0.033 4	1.21*	0.042 5	1.18	0.083 2
Glutamine	0.83*	0.003 4	1.14*	0.013 6	1.14*	0.026 2
Glutamate	1.27*	0.000 4	0.89	0.077 4	0.94	0.412 8
Aspartate	1.89*	0.001 0	0.72	0.090 9	0.87	0.335 3
Taurine	1.21*	0.001 5	0.87*	0.024 1	0.86*	0.006 0
Proline	1.21*	0.000 4	0.90*	0.047 0	0.90*	0.019 3
Valine	1.26*	0.021 3	0.89	0.376 1	1.15	0.197 2
Homocitrulline	1.35*	0.000 1	0.76*	0.001 2	0.97	0.638 1
Acetate	1.62*	0.014 6	0.78	0.212 6	0.98	0.924 5
Propylene glycol	1.75*	0.005 2	0.82	0.330 6	0.75*	0.033 5
Choline	1.78*	0.000 4	0.73	0.058 0	1.03	0.828 7
Uridine	2.37*	0.000 9	0.66	0.087 6	0.99	0.971 2

3 QDP化学成分与其对应靶点

在TCMIP数据中共得到124种化学成分,并获得与之对应的潜在靶点400个。其中,黄芪的化学成分有24种,包括黄芪甲苷、葡萄糖醛酸、叶酸、胆碱等,潜在靶点有266个,包括糖、脂、ATP和蛋白质代谢相关靶点75个;丹参的化学成分有35种,包括原儿茶醛、迷迭香酸、丹酚酸等,潜在靶点有216个,包括糖、脂、ATP和蛋白质代谢相关靶点52个;三七的化学成分有44种,包括人参皂苷、三七皂苷等,潜在靶点有210个,包括糖、脂、ATP和蛋白质代谢相关靶点66个;降香的化学成分有26种,包括异黄酮类、甘草素等,潜在靶点有101个,包括糖、脂、ATP、蛋白代谢相关靶点20个。成药性等级为Good的化合物信息见表2。

4 HF相关靶点

从DisGeNet数据库获得HF相关靶点660个,从GeneCards数据库获得HF相关靶点1124个,从OMIM数据库获得HF相关靶点1947个,3个疾病数据库获得HF相关的靶点去除重复后共有1598个。

5 “药物-成分-靶点-疾病”网络的构建与分析

将得到的HF相关靶点与QDP化学成分的靶点进行比对,得到107个交集靶点。利用Cytoscape构建“药物-成分-靶点-疾病”的调控网络,共包含222个节点和962条边,拓扑分析获得19个关键化学成分,包括熊果酸、齐墩果酸、槲皮素等。根据与糖、脂、ATP、蛋白质等代谢相关靶点及其对应化学成分提取子网络,由47个糖、脂、ATP和蛋白质代谢相关靶点和79个化学

Table 2 Information of chemical compounds with good druglike-ness

No.	Compound	Molecular formula	Source
1	Kumatakenin	C ₁₇ H ₁₄ O ₆	HUANGQI
2	Danshenol B	C ₂₂ H ₂₆ O ₄	DANSHEN
3	Miltionone I	C ₁₉ H ₂₀ O ₄	DANSHEN
4	Sugiol	C ₂₀ H ₂₈ O ₂	DANSHEN
5	Salviol	C ₂₀ H ₃₀ O ₂	DANSHEN
6	Neocryptotanshinone II	C ₁₇ H ₁₈ O ₃	DANSHEN
7	Paramiltioic acid	C ₁₉ H ₂₄ O ₅	DANSHEN
8	Miltipolone	C ₁₉ H ₂₄ O ₃	DANSHEN
9	Miltionone II	C ₁₉ H ₂₀ O ₄	DANSHEN
10	1-Keto-isocryptotanshinone	C ₁₉ H ₁₈ O ₄	DANSHEN
11	2-Isopropyl-8-methylphenanthrene-3,4-dione (R0-090680)	C ₁₈ H ₁₆ O ₂	DANSHEN
12	Hesperetic acid	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	DANSHEN
13	Miltirone	C ₁₉ H ₂₂ O ₂	DANSHEN
14	Ferruginol	C ₂₀ H ₃₀ O	DANSHEN
15	2,6-Ditertbutyl-4-methyl phenol	C ₁₅ H ₂₄ O	SANQI
16	Sativanone	C ₁₇ H ₁₆ O ₃	JIANGXIANG
17	Melilotocarpan C	C ₁₈ H ₁₈ O ₆	JIANGXIANG
18	Odicarpan	C ₁₈ H ₁₈ O ₆	JIANGXIANG
19	3'-O-Methylviolanone	C ₁₈ H ₁₈ O ₆	JIANGXIANG
20	(3R)-5'-Methoxyvestitol	C ₁₇ H ₁₈ O ₅	JIANGXIANG
21	2',7-Dihydroxy-4',5'-dimethoxyisoflavone	C ₁₇ H ₁₄ O ₆	JIANGXIANG
22	Isoduartin	C ₁₈ H ₂₀ O ₆	JIANGXIANG
23	Dalbergichromene	C ₁₆ H ₁₄ O ₃	JIANGXIANG
24	Xenogonin B	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	JIANGXIANG
25	3'-Methoxydaidzein	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	JIANGXIANG
26	Liquiritigenin	C ₁₅ H ₁₂ O ₄	JIANGXIANG
27	(3R)-Vestitol	C ₁₆ H ₁₆ O ₄	JIANGXIANG
28	Bowdichione	C ₁₆ H ₁₀ O ₆	JIANGXIANG
29	(3R)-4'-Methoxy-2',3,7-trihydroxyisoflavanone	C ₁₆ H ₁₄ O ₆	JIANGXIANG
30	Methyl 2-hydroxy-3,4-dimethoxy benzoate	C ₁₀ H ₁₂ O ₅	JIANGXIANG
31	Koparin	C ₁₆ H ₁₂ O ₆	JIANGXIANG
32	Dalbergin	C ₁₆ H ₁₂ O ₄	JIANGXIANG
33	Isodalbergin	C ₁₆ H ₁₂ O ₄	JIANGXIANG

成分组成,包括熊果酸、三七皂苷、人参皂苷等关键化学成分,见图4。其中,与ATP代谢相关的靶点共9个,其对应的化学成分共4个;与糖代谢相关的靶点共27个,其对应的化学成分共68个;与脂代谢相关的靶点共23个,与其对应的化学成分共70个;与蛋白质代谢相关的靶点共2个,与其对应的化学成分共40个。

6 蛋白相互作用网络的构建与分析

将107个交集靶点导入STRING数据库进行蛋白相互作用网络构建和筛选,结果导入Cytoscape中。蛋白相互作用网络中包含105个节点和729条边。应用cytoHubba插件,提取位于Top10的Hub靶点,见图5A。结果显示,与能量代谢相关的过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (peroxisome proliferator-activated receptor gamma, PPAR γ)、RAC α 丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 (RAC α -alpha serine/threonine-protein kinase, AKT1) 和胰岛素

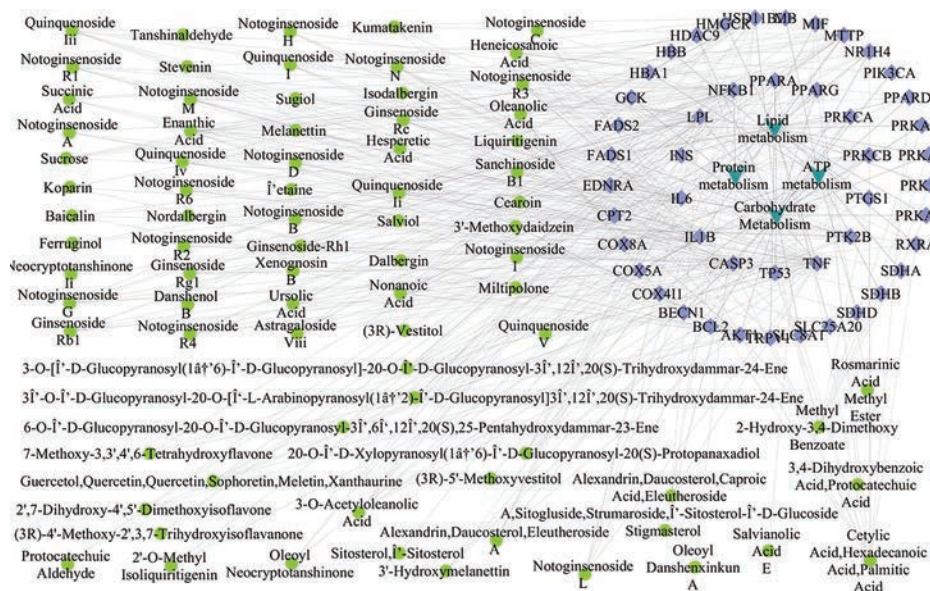


Figure 4 The regulatory network of "compound-target-metabolic process". Green presents compounds. Purple presents targets. Blue presents metabolic processes

(insulin, INS) 等核心节点可能是 QDP 调节能量代谢的重要靶点。应用 MCODE 插件对蛋白相互作用网络进行模块划分与聚类, 共得到 7 个模块, 依据聚类 Score 值, 将排名前三的模块作为核心模块。其中模块一 (图 5B) 和模块三 (图 5D) 包含较多与能量代谢相关的靶点, 模块二 (图 5C) 中的靶点主要与钠离子通道相关。

7 GO 富集分析和 KEGG 通路富集分析

7.1 GO 富集分析 对每个模块进行了 GO 富集分析。模块一共富集出 450 个生物过程、8 个细胞组分和 32 个分子功能, 主要涉及氧化应激与炎症反应、糖脂代谢和细胞凋亡等; 模块二共富集出 29 个生物过程、8 个细胞组分和 9 个分子功能, 主要涉及动作电位、钠

通道复合体等; 模块三共富集出 7 个生物过程、6 个细胞组分和 8 个分子功能, 生物过程主要涉及有氧呼吸、ATP 代谢过程等。GO 富集结果 (图 6) 显示 QDP 通过参与包括葡萄糖代谢、脂肪酸代谢、ATP 代谢在内的多条生物学途径发挥作用。

7.2 KEGG 通路富集分析 对每个模块进行了 KEGG 富集分析。模块一共富集出 149 条通路, 与能量代谢相关的通路主要包括脂质与动脉粥样硬化 (lipid and atherosclerosis)、AMPK 信号通路 (AMPK signaling pathway) 和 PPAR 信号通路 (PPAR signaling pathway) 等 (图 7A); 模块二共富集出 1 条通路, 为心肌细胞中的肾上腺素信号通路 (adrenergic signaling in cardiomyo-

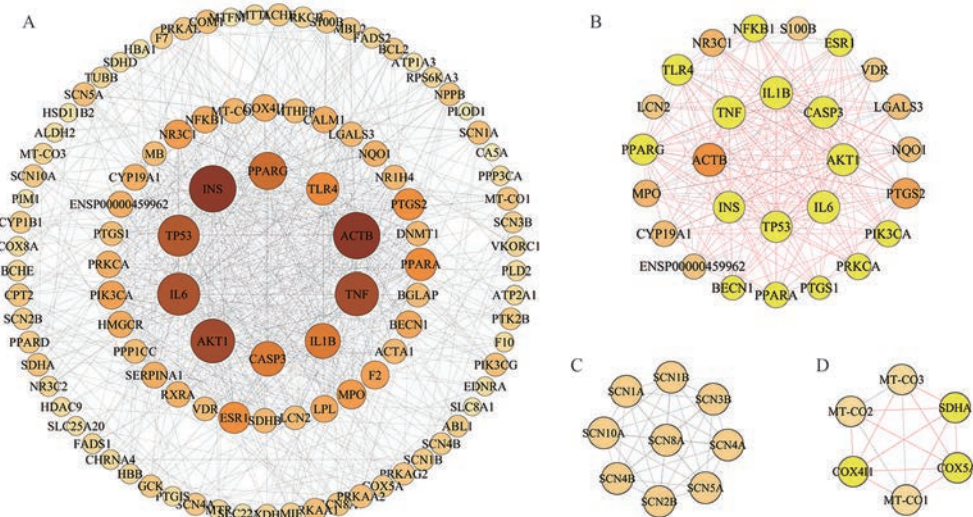


Figure 5 Protein interaction networks of intersecting gene (A), cluster 1 (B), cluster 2 (C), cluster 3 (D). Targets in yellow present targets associated with material and energy metabolism

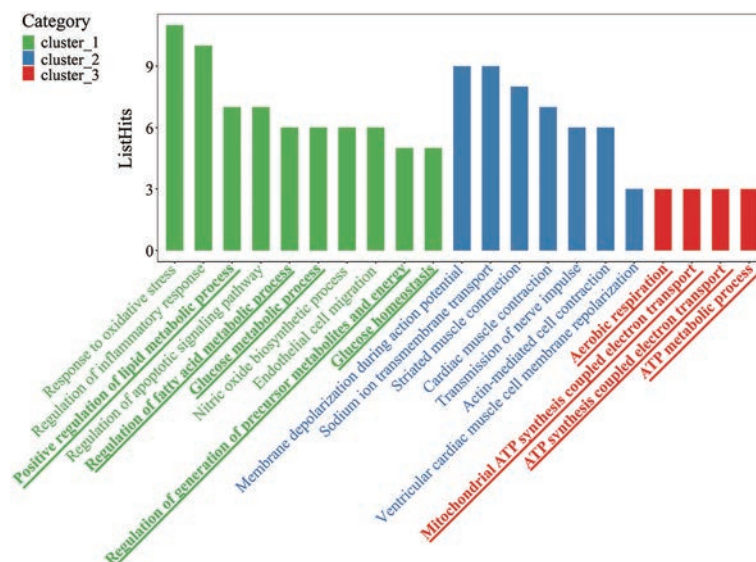


Figure 6 GO enrichment analysis results. Biological processes associated with material and energy metabolism are in bold with underline

cytes); 模块三共富集出 14 条通路, 与能量代谢相关的通路主要包括氧化磷酸化 (oxidative phosphorylation)、三羧酸循环 (TCA cycle) 等 (图 7B)。

8 化学成分-靶点分子对接验证

应用 AutoDock Vina 软件对 IL6、PTGS2、TNF、IL1B、CASP3、PPARG、AKT1 等关键靶点与网络中 degree 值 ≥ 12 的化学成分进行分子对接验证。根据对接结果 (表 3) 中的 affinity 指标判断靶点与化学成分之间的亲和力, 其中 astragaloside VIII 与 CASP3 的结合能最低, 为 $-8.8 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$, 平均结合能为 $-6.2 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$, 显示网络中关键靶点与关键化学成分对接良好。同时对与糖、脂、ATP 和蛋白质代谢相关靶点 AKT1、PPARG、LPL 与其对应化学成分分别进行分子对接验证, 用 Pymol 软件对其对接结果进行可视化 (图 8), 显

示 QDP 化学成分与这些靶点对接良好。

讨论

HF 的发病机制与心脏代谢功能密切相关, 在衰竭心脏中, 心肌细胞线粒体功能和高能磷酸盐异常等病理因素导致心脏代谢重塑, 进一步加速 HF 进程, 因此, 调节能量代谢是治疗 HF 的重要策略^[16]。基础研究显示 QDP 能够改善心脏功能和能量代谢^[17]。

本研究对大鼠心脏结扎部位与结扎部位远端的组织进行了代谢组学研究, 结果显示, 结扎部位各组样本给药组与模型组组间差异不显著, 这可能是由于手术结扎导致该部位组织受损严重, QDP 治疗作用难以带来显著的改善。结扎部位远端组织代谢轮廓在组间具有显著分离, 表明 QDP 可通过干预心脏冠脉下游的微

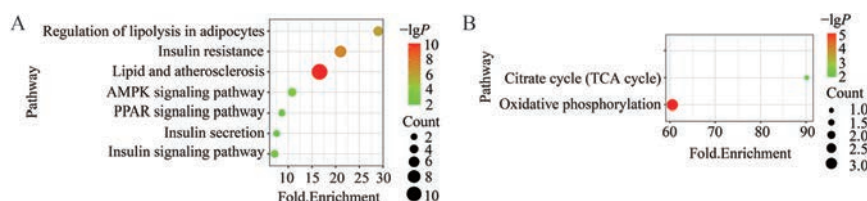


Figure 7 KEGG enrichment analysis results associated with material and energy metabolism. A: KEGG enrichment analysis results of cluster 1; B: KEGG enrichment analysis results of cluster 3

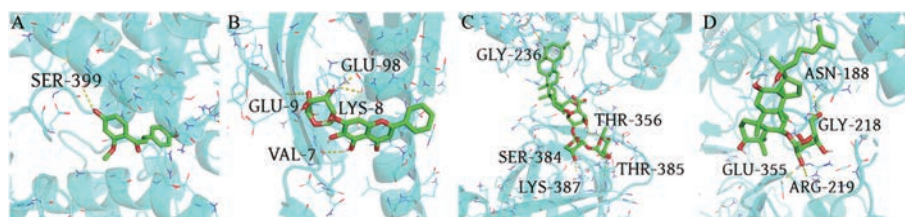


Figure 8 Molecular docking modes of targets associated with energy metabolism, including PPARG and 2'-O-methyl isoliquiritigenin (A), AKT1 and baicalin (B), LPL and astragaloside VIII (C), LPL and ginsenoside-Rh1 (D)

Table 3 Docking results of key target molecules and the key compounds of QDP (affinity ≤ -5 kcal·mol⁻¹)

Target	Compound	Affinity / kcal·mol ⁻¹
IL6	Ginsenoside-Rh1	-6.4
IL6	Sanchinoside B1	-7.1
IL6	Astragaloside VIII	-7.0
IL6	Notoginsenoside G	-6.8
IL6	Quinquenoside IV	-7.4
IL6	Quinquenoside III	-6.6
IL6	Quinquenoside I	-6.7
IL6	Quinquenoside II	-6.0
PTGS2	Enanthic acid	-5.0
TNF	3- <i>O</i> -Acetyloleanolic acid	-7.3
TNF	Ginsenoside-Rh1	-7.1
TNF	Sanchinoside B1	-7.8
TNF	Astragaloside VIII	-8.2
TNF	Notoginsenoside G	-7.3
TNF	Quinquenoside IV	-7.1
TNF	Quinquenoside III	-7.3
TNF	Quinquenoside I	-7.1
TNF	Quinquenoside II	-7.0
IL1B	Ginsenoside-Rh1	-7.0
IL1B	Sanchinoside B1	-6.7
IL1B	Astragaloside VIII	-7.4
IL1B	Notoginsenoside G	-6.6
IL1B	Quinquenoside IV	-6.9
IL1B	Quinquenoside III	-7.4
IL1B	Quinquenoside I	-7.0
IL1B	Quinquenoside II	-6.7
CASP3	3- <i>O</i> -Acetyloleanolic acid	-6.6
CASP3	Ginsenoside-Rh1	-7.0
CASP3	Sanchinoside B1	-7.6
CASP3	Astragaloside VIII	-8.8
CASP3	Notoginsenoside G	-7.3
CASP3	Quinquenoside IV	-7.3
CASP3	Quinquenoside III	-7.5
CASP3	Quinquenoside I	-6.7
CASP3	Quinquenoside II	-7.5
AKT1	Guercetol, quercetin	-6.4
AKT1	Nordalbergin	-6.2
AKT1	Baicalin	-6.7

循环代谢网络对 HF 大鼠产生有益作用。通过差异代谢物及其富集通路分析发现,在 HF 和 QDP 干预下,大鼠心脏组织中丙酮酸代谢、脂肪酸代谢、氨基酸代谢、糖酵解及能量代谢等生物过程发生了相应的变化。肉碱作为脂肪酰辅酶 A 线粒体输入能力的标志物,在晚期 HF 患者和多种动物模型心肌中降低^[18,19]。在本研究中, QDP 干预后 HF 大鼠肉碱水平显著回升,显示 QDP 改善了脂肪酸与葡萄糖代谢平衡。肌酸参与 ATP 的存储, HF 患者总肌酸池大小减少^[20]。 QDP 干预后, HF 大鼠心肌组织中肌酸显著回升,表明 QDP 可能通过调控肌酸水平改善心肌功能。 QDP 治疗的 HF 大鼠中谷氨酰胺水平显著回升, 研究报道谷氨酰胺可通过多种机制对冠状动脉疾病患者心脏发挥保护作用^[21-23], 如参与心肌能量代谢^[23], 提示 QDP 可能通过提高谷氨酰胺水平发挥调节心肌能量代谢的作用。因

此,从代谢组学结果来看, QDP 对 HF 大鼠心脏组织的糖、脂、ATP 和蛋白质代谢具有有益调节作用。

在网络药理学研究中,提取出与糖、脂、ATP 和蛋白质代谢相关靶点及其对应化学成分构成的子网络,由 47 个靶点和 79 个化学成分构成,包括熊果酸、三七皂苷、人参皂苷等关键化学成分和 INS、PPARG、AKT1 等核心靶点, QDP 可广泛地调控能量代谢,包括糖、脂、ATP 和蛋白质等代谢过程,其中主要调控糖脂代谢。有研究报道,熊果酸可有效改善糖脂代谢紊乱,提高胰岛素敏感性,调节代谢相关酶类的表达^[24]; 槲皮素可调节脂质代谢紊乱^[25]; 人参皂苷 Rh1 可调节大鼠多条代谢通路,特别是三羧酸循环代谢通路^[26]。PPARG 是脂肪细胞分化和葡萄糖稳态的关键调节因子,与动脉粥样硬化密切相关。AKT 对糖代谢的调节起着重要的作用, Zhang 等^[27]发现 QDP 通过激活 PI3K-Akt 信号通路抑制高糖诱导的心肌细胞凋亡。INS 与受体结合介导胰岛素信号传导,衰竭心脏心肌细胞内胰岛素信号的变化可能导致不良的左心室重构和线粒体功能障碍^[28]。分子对接结果也进一步验证了化学成分与靶点之间良好的相互作用关系。

本研究采用代谢组学和网络药理学联合方式研究构建了 QDP 调节能量代谢相关“成分-靶点”网络,该网络不仅展示了 QDP 调节糖、脂、ATP 和蛋白质代谢潜在的作用靶点和药效物质基础,提炼了其中的关键化学成分与核心靶点,同时也从能量代谢的角度展示了 QDP 与 HF 之间多靶点、多成分的复杂作用关系,以上研究结果为 QDP 临床应用及方剂开发利用提供了有用信息。

本研究同时也发现这种研究方式的不足,首先采用数据库对化学成分进行靶点预测有一定的局限性;其次,在本研究中筛选得到的部分化合物在中药中含量低,如 quinquenosides 在三七中含量很低,这些微量成分对于复方药效的贡献度有多大值得探讨。因此,本研究所提供的信息首先应该进行相应的验证分析,这包括动物体内体外的一系列生物学验证及相关的组学研究。同时,通过对中药及复方的定性定量分析后获得的化学成分准确信息后再进行靶点预测,进而提高预测的准确性。

作者贡献: 吕雪琪和王映红负责整体设计、数据分析和文章撰写;许悦和靳香菊负责心脏代谢组学实验;郭聪聪负责文献整理和论文修改。

利益冲突: 本文无利益冲突。

References

- [1] Expert Committee on Rational Drug Use of the National Health and Family Planning Commission, Chinese Pharmacists Asso-

- ciation. Guidelines for rational use of drugs of heart failure (2 edition) [J]. Chin J Front Med Sci (中国医学前沿杂志), 2019, 11: 1-78.
- [2] Baman JR, Ahmad FS. Heart failure [J]. JAMA, 2020, 324: 1015.
- [3] Snipelisky D, Chaudhry SP, Stewart GC. The many faces of heart failure [J]. Card Electrophysiol Clin, 2019, 11: 11-20.
- [4] Xu Y, Wang YH, Liu JB. Clinical effect of Qishen Yiqi dropping pills in the treatment of coronary heart disease complicated with pre-clinical heart failure due to Qi deficiency with blood stasis and its impact on cardiac function of on coronary heart disease with preclinical heart failure of patients [J]. Pract J Cardiac Cereb Pneum Vasc Dis (实用心脑血管病杂志), 2021, 29: 97-101, 111.
- [5] Chen SL, Wu Y. Effects of Qishen Yiqi dripping pills and Shensong Yangxin capsules on myocardial protein and inflammation in CHF patients with Qi deficiency and blood stasis syndrome [J]. Chin J Drug Abuse Prev Treat (中国药物滥用防治杂志), 2021, 27: 932-935.
- [6] Ikegami R, Shimizu I, Yoshida Y, et al. Metabolomic analysis in heart failure [J]. Circ J, 2017, 82: 10-16.
- [7] Jin WM, Mu DP. Metabolomics study of Qishen Yiqi dropping pills for acute myocardial infarction in rats [J]. Tianjin Pharm (天津药学), 2015, 27: 9-13.
- [8] Tian G, Hu YZ, Li C, et al. The mechanism of action of Pudilan Xiaoyan oral liquid against LPS-induced acute respiratory infection in mice based on biological network analysis and metabolomics [J]. Acta Pharm Sin (药理学学报), 2021, 56: 816-822.
- [9] Hopkins AL. Network pharmacology: the next paradigm in drug discovery [J]. Nat Chem Biol, 2008, 4: 682-690.
- [10] Ou HY, Ye XP, Xu YQ, et al. Based on molecular technology to explore the material basis and medication rule of inhibiting *Helicobacter pylori* urease (HPU) activity by traditional Chinese medicine [J]. Res Pract Chin Med (现代中药研究与实践), 2021, 35: 27-32.
- [11] Chen JX, Liu XX, Chen YW, et al. Inhibitory effect and mechanism of Qishenyiqi dropping pill on myocardial apoptosis in chronic heart failure rats [J]. J Jilin Univ (Med Ed)[吉林大学学报(医学版)], 2020, 46: 972-978, 1113.
- [12] Yin CY, Li WD, Wang CH, et al. Influence of valsartan on sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase and phospholamban in rats with dilated cardiomyopathy [J]. Anhui Med Pharm J (安徽医药), 2010, 14: 143-146.
- [13] Tang YN. Effects of Electroacupuncture Neiguan Preconditioning on Myocardial Tissue Metabolites in MIRI Rats Based on 1H NMR (基于 1H NMR研究电针内关预处理对MIRI大鼠心肌组织代谢物的影响) [D]. Changsha: Hunan University of Chinese Medicine, 2018.
- [14] Liu QF, Lv XQ, Guo CC, et al. Study on the effect of metformin in improving lipid metabolism disorder based on nuclear magnetic flux and metabolome technology [J]. Acta Pharm Sin (药理学报), 2021, 56: 1109-1119.
- [15] Xu HY, Zhang YQ, Liu ZM, et al. ETCM: an encyclopaedia of traditional Chinese medicine [J]. Nucleic Acids Res, 2019, 47: D976-D982.
- [16] Li J. Protective Effect of Qishen Yiqi Recipe in Regulating Energy Metabolism in Chronic Heart Failure (芪参益气方调节慢性心衰能量代谢的作用机制研究) [D]. Tianjin: Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, 2020.
- [17] Han JY. Scientific connotation of cardiac Qi deficiency and stasis of blood, and the mechanism of Qishen Yiqi dropping pills in invigorating qi and activating blood [J]. World Sci Technol Mod Tradit Chin Med Mater Med (世界科学技术-中医药现代化), 2019, 21: 139-147.
- [18] Schugar RC, Moll AR, André d'Avignon D, et al. Cardiomyocyte-specific deficiency of ketone body metabolism promotes accelerated pathological remodeling [J]. Mol Metab, 2014, 3: 754-769.
- [19] Peterzan MA, Lygate CA, Neubauer S, et al. Metabolic remodeling in hypertrophied and failing myocardium: a review [J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2017, 313: H597-H616.
- [20] Hove MT, Lygate CA, Fischer A, et al. Reduced inotropic reserve and increased susceptibility to cardiac ischemia/reperfusion injury in phosphocreatine-deficient guanidinoacetate-N-methyltransferase-knockout mice [J]. Circulation, 2005, 111: 2477-2485.
- [21] Ma X, Li YC. Glutamine and myocardial ischemia-reperfusion injury [J]. Chin J Arterioscler (中国动脉硬化杂志), 2007, (11): 873-875.
- [22] Khogali S, Pringle SD, Weryk BV, et al. Is glutamine beneficial in ischemic heart disease? [J]. Nutrition, 2002, 18: 123-126.
- [23] Papandreou C, Hernández-Alonso P, Bulló M, et al. High plasma glutamate and a low glutamine-to-glutamate ratio are associated with increased risk of heart failure but not atrial fibrillation in the Prevención con Dieta Mediterránea (PREDIMED) Study [J]. J Nutr, 2020, 150: 2882-2889.
- [24] Ma SL, Liu R, Wang JH. Research progress on anti-metabolic syndrome effect mechanism of ursolic acid [J]. World Sci Technol Mod Tradit Chin Med Mater Med (世界科学技术-中医药现代化), 2020, 22: 2578-2582.
- [25] Li ZF, Zhang H, Ren M, et al. Protective effect of quercetin on lipid metabolism disorder in mice livers caused by cadmium [J]. Lab Anim Comp Med (实验动物与比较医学), 2021, 41: 305-312.
- [26] Wang XF. The Study on Anti-fatigue of Ginsenoside Rh 1 Based on Metabonomics 基于代谢组学的人参皂苷Rh1的抗疲劳研究) [D]. Qingdao: Qingdao University, 2020.
- [27] Zhang S, Wang H, Li L, et al. Qishen Yiqi drop pill, a novel compound Chinese traditional medicine protects against high glucose-induced injury in cardiomyocytes [J]. J Cell Mol Med, 2019, 23: 6393-6402.
- [28] Riehle C, Abel ED. Insulin signaling and heart failure [J]. Circ Res, 2016, 118: 1151-1169.