

基于网络药理学分析石上柏抗心肌缺血的作用机制研究

李思慧^{1*}, 秦瑶², 朱蕾¹, 孟从炳¹, 秦桂芳¹, 刘超¹, 王刚^{1#}

¹遵义医科大学药学院, 贵州 遵义

²遵义医科大学第一附属医院心内科, 贵州 遵义

收稿日期: 2021年9月17日; 录用日期: 2021年11月17日; 发布日期: 2021年11月29日

摘要

目的: 借助网络药理学筛选石上柏抗心肌缺血的潜在信号通路及靶点, 并探究石上柏抗心肌缺血的潜在作用机制。方法: 通过TCMSP平台和相关文献根据口服生物利用度、类药性筛选获取石上柏化合物; 利用数据库(PubChem、Swiss Target Prediction, Gene Cards)预测化合物靶点与疾病靶点; 运用Cytoscape 3.7.2构建“成分-靶点”网络; 采用Bioinformatics做出两者交集靶点的韦恩图并构建PPI网络进行GO和KEGG富集分析。结果: 筛选出17个石上柏化合物, 395个作用靶点, 其中抗心肌缺血靶点120个; 石上柏抗心肌缺血主要作用VEGFA、TNF、TP53、PTGS2、JUN等靶蛋白; GO分析中, 生物途径涉及MAPK级联反应的调控, 细胞组分包括膜瓣、膜微区, 分子功能分析中有受体、酶、转录因子参与; KEGG富集通路共286条, 其中重要通路有AGE-RAGE信号通路、神经活性配体-受体相互作用通路。结论: 研究表明石上柏中穗花杉双黄酮、芹菜素、大麦芽碱等可能对心肌缺血有治疗作用。初步推测出石上柏抗心肌缺血主要靶基因和通路, 为石上柏抗心肌缺血研究提供新方向。

关键词

石上柏, 心肌缺血, 网络药理学, 作用机制

Network Pharmacology-Based to Analyze Screen *Selaginella Doederleinii*'s against Myocardial Ischemia

Sihui Li^{1*}, Yao Qin², Lei Zhu¹, Congbing Meng¹, Guifang Qin¹, Chao Liu¹, Gang Wang^{1#}

¹School of Pharmacy, Zunyi Medical University, Zunyi Guizhou

²Department of Cardiology, Affiliated Hospital of Zunyi Medical University, Zunyi Guizhou

*第一作者。

#通讯作者。

文章引用: 李思慧, 秦瑶, 朱蕾, 孟从炳, 秦桂芳, 刘超, 王刚. 基于网络药理学分析石上柏抗心肌缺血的作用机制研究[J]. 中医学, 2021, 10(6): 840-854. DOI: 10.12677/tcm.2021.106117

Abstract

Objective: To explore the potential signaling pathways and mechanism of *Selaginella doederleinii*'s anti-myocardial ischemia using network pharmacology. **Methods:** the compounds about *Selaginella doederleinii* were obtained through the TCMSP and related literature and screened according to the oral bioavailability and drug-like properties; the databases (Pub Chem, Swiss Target Prediction, Gene Cards) were used to predict compound targets and the disease targets, then by the Bioinformatics and "component-target" network was constructed by Cytoscape 3.7.2; finally, a Wayne diagram of the intersection targets was made at Bioinformatics and a PPI network was constructed for GO and KEGG enrichment analysis. **Results:** There were 17 *Selaginella doederleinii* compounds and 395 targets of which included 120 anti-myocardial ischemia targets. The main anti-myocardial ischemia proteins are VEGFA, TNF, TP53, PTGS2, and JUN. In GO analysis biological pathways involved the regulation of the MAPK cascade; cell components comprised membrane valves, membrane microdomains; molecular function analysis involved receptors, enzymes, and transcription factors. There were 286 KEGG enrichment pathways, among which the important pathways were the AGE-RAGE signaling pathway in diabetic complications and neuroactive ligand-receptor interaction etc. **Conclusion:** The research suggested that by network pharmacology, amentoflavone, apigenin, hordenine, etc. might have therapeutic effects on myocardial ischemia. The main target genes and pathways of resistance to myocardial ischemia were preliminarily predicted, which provided a new direction for the study of resistance to myocardial ischemia.

Keywords

Selaginella Doederleinii, Myocardial Ischemia, Network Pharmacology, Mechanism

Copyright © 2021 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

2018 年心血管疾病死亡占我国城乡居民总死亡原因首位, 且有着年轻化的趋势[1]。心肌缺血 (myocardial ischemia) 传统中医认为此乃本虚标实之症, 《黄帝内经·素问·痹论篇》记载[2] “心痹者, 脉不通, 烦则心下鼓, 暴上气而喘”, 将其归为“心痛”、“胸痹”等, 分为四种类型: 气血淤阻、气滞心胸、痰浊闭阻及气阴两虚。现代医学对于心肌缺血发生机制没有明显的定义, 但经分析常与自由基损伤、细胞内钙超载、炎症损伤等有关[3]。目前已有单味中药提取物应用于心肌缺血, 如苗药狭叶崖爬藤通过减轻心肌细胞损伤、缓解氧化应激和炎症反应减轻心肌缺血[4]; 藏红花通过减少氧化应激和调节 Ca²⁺稳态改善心肌缺血[5]。

石上柏是卷柏科卷柏属植物深绿卷柏 *Selaginella doederleinii* Hieron. 的全草, 其性味甘、微苦、微凉, 有清热解毒、祛风除湿等功效, 常用于目赤肿痛、风湿痹痛等[6]。石上柏中含有多种成分[7], 主要有双黄酮、生物碱类、木脂素类、有机酸类, 这些成分在抗肿瘤、抗氧化、抑制血小板的聚集等方面表现出良好药效[8] [9] [10]。目前, 关于石上柏抗心肌缺血作用的成分研究极少, 石上柏中清除自由基及抑制血小板聚集等作用是否对心肌细胞有保护作用, 还有待研究。

网络药理学在分析分子靶点与药物之间相互作用、预测药物的药理作用机制、探索药物对疾病作用

的可能作用靶点等方面有着周期短、操作性强等优势[11]。本研究选择石上柏为研究对象,通过 TCMSP 平台及文献筛选石上柏中符合目标的小分子化合物,通过疾病靶点数据库筛选,运用 Cytoscape 3.7.2 构建多成分-靶点网络药理图,经 GO 和 KEGG 富集分析推测出石上柏抗心肌缺血主要靶基因和通路,为石上柏抗心肌缺血后续研究提供方向。

1.1. 石上柏化合物的收集与筛选

采用中药系统药理学数据库和分析平台(TCMSP) [12],以“石上柏”作为关键词,检索全部化合物,以口服生物利用度(Oral Bioavailability, OB)和类药性(Drug-Likeness, DL)作为筛选标准,得到石上柏中化合物,结合相关文献报道整理得到石上柏有效成分。

1.2. 石上柏有效成分靶点预测及心肌缺血靶点筛选

将石上柏有效成分导入 Pub Chem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)数据库[13],在 Biological Test Results 选项下查找成分靶点,以“9606, active”筛选,得到成分对应靶点;将下载好的有效成分 2D 结构,导入 Swiss Target Prediction 数据库[14],以概率大于 0.1 筛选靶点,整理石上柏有效成分对应靶点蛋白信息。

以“myocardial ischemia”为关键词,在 Gene Cards 数据库[15]中进行检索,获得心肌缺血相关靶点蛋白。

1.3. 基因映射

将石上柏预测靶点与疾病靶点通过 Uniprot 数据库[16]校正靶点蛋白,导入微生信在线工具(<http://www.bioinformatics.com.cn/>),利用集合运算韦恩图在线工具获得石上柏有效成分对应心肌缺血靶点蛋白,以韦恩图表示两者关系。

1.4. 成分-靶点网络构建

将石上柏有效成分及对应疾病靶点导入 Cytoscape3.2.7 软件[17],构建石上柏抗心肌缺血网络关系图,根据度值(Degree)对其进行筛选,得出石上柏抗心肌缺血的有效活性成分及与靶点之间的作用关系。

1.5. 靶点蛋白 PPI 网络构建

将石上柏有效成分靶点与疾病靶点交集部分基因导入 String 数据库[18],选择研究物种为“Home sapiens”,得到靶点蛋白之间相互作用关系图,导入 Cytoscape3.2.7 软件,绘制靶点蛋白网络图,根据度值调节网络图,表示蛋白之间的互作关系。

1.6. 功能分析

为进一步明确成分靶点参与的功能与涉及的信号通路,将石上柏有效成分对应靶点蛋白导入 Metascape(<http://metascape.org/>)数据库[19],选择研究物种为“Home sapiens”,依次进行 GO 分析包括生物途径(BP)、细胞组分(CC)、分子功能(MF)和 KEGG 通路富集分析,根据 P 值大小取前二十条与研究相关分析条目作出富集分析图,表示石上柏成分抗心肌缺血可能涉及的信号通路和需要参与的生物途径。

2. 结果

2.1. 石上柏有效成分及靶点筛选

通过 TCMSP 数据库搜索石上柏有关化合物及其查找石上柏相关文献,得到石上柏有效成分 17 个编号为 JP1-JP17(见表 1),包括穗花杉双黄酮、芹菜素、大麦芽碱、没食子酸、小檗碱等。经 PubChem 数据库和

Swiss Target Prediction 数据库检索成分对应靶点共有 395 个, 通过与 GeneCards 数据库检索疾病靶点相映射后, 得到石上柏抗心肌缺血靶点蛋白 120 个(见表 1), 成分靶点与疾病靶点交集韦恩图如图 1。由表 1 可知一种有效成分可对应多个靶点, 一个靶点可对应不同的化合物, 表明了多靶点多成分治疗疾病的特点。

Table 1. Active ingredients contained and corresponding targets in *Selaginella doederleinii*

表 1. 石上柏有效成分及对应靶点

序号	化合物	英文名	对应疾病靶点蛋白
JP1	穗花杉双黄酮	Amentoflavone	GABRA1 PGF VEGFA OPRD1 OPRK1 ELANE MMP9 HTR2C PTPN1 VCP MAPT PLA2G2A MMP2 ESR2 PLA2G7 CDK5R1
JP2	罗汉松双黄酮 A	Podocarpusflavone A	CBS VCP PGF VEGFA GABRA1 HTR2C OPRD1 PTPN1
JP3	罗伯斯塔双黄酮	Robustaflavone	ELANE PTPN1 MMP2 MMP9
JP4	银杏双黄酮	Ginkgetin	PTPN1 VCP PGF VEGFA HTR2C OPRD1
JP5	异银杏双黄酮	Isoginkgetin	PGF VEGFA HTR2C OPRD1 PTPN1
JP6	橡胶树双黄酮	Heveaflavone	VEGFA HTR2C OPRD1 VCP
JP7	芹菜素	Apigenin	ACHE CYP1B1 PIM1 ESR2 DPP4 TTR OPRK1 OPRM1 XDH MAOA TTR CYP19A1 OPRD1 MAOB NOX4 ESR1 CYP3A4 GSK3B FLT3 CDK5R1 ESRRA GABRA1 PGR ABCG2 PRKN MPO ALOX15 AR NR3C1 ESR2 CYP2C19 PTGS2 HDAC9 CFTR ABCB1 AKR1B1 HIF1A TP53 MAPT PPARD PPARG BRCA1 NFE2L2 APP NR1I2 DAPK1 BCHE NR1H4 ELANE VDR PIM1 GNAI1 IL1B INSR CYBB SMAD3 SMAD2 NFKB1 RELA
JP8	扁柏双黄酮	Hinokiflavone	KIT PIM1 ADORA1 ADORA2A FLT3 AKR1B1 ADORA3 PTGS2 CYP1B1
JP9	大麦芽碱	Hordenine	DRD2 OPRM1 OPRK1 OPRD1 DRD1 SLC6A2 SLC6A3 HTR2A HTR2C ADRB2 HRH3 ADRA2A ADRA2C HTR3A SLC6A4 ADRB1 MAOA ADRA1A ADRB3 HTR2B AOC3 GAPDH MAOB ADRA2B SCN5A
JP10	莽草酸	Shikimic acid	CFTR SLC6A4 TNF ITGAL PTGER3 NOS2 CYP19A1 PRKCA RORA
JP11	没食子酸	Gallic acid	MAPT CA1 NFE2L2 DPP4 CA9 CA3 CA5B TP53 SELP GAPDH SELL ESRRA VDR JUN APP
JP12	棕榈酸	Palmitic acid	FABP4 ESR1 PPARA FABP2 FABP3 TLR2 PPARD PPARG
JP13	鹅掌楸树脂酚 B 二甲醚	Isopimpinellin	PTPN1 ALOX5 SOAT1 HIF1A SHBG SLC6A2 OPRM1 MAPK9 ALOX15 ALOX12
JP14	丁香酸	Yangambin	CA1 CA9 CA3 CA5B
JP15	小檗碱	Syringic acid	CYP1B1 ACHE BCHE CYP2D6 TERT GAPDH PRKAB1 PRKAA2 PRKAA1 PRKAG2 YAP1
JP16	川陈皮素	berbine	KCNMA1 CYP3A4 ABCG2 AKR1B1 CYP1B1 OPRD1 KIT OPRM1 NOX4 ALOX5
JP17	异回芹内酯	Nobiletin	CYP3A4 CYP1B1

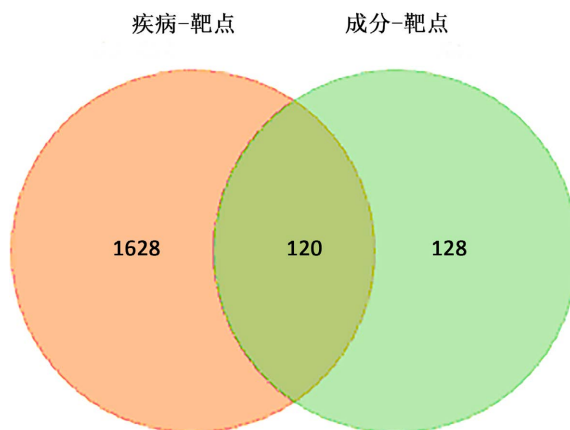


Figure 1. Venn diagram of the intersection of component targets and disease targets

图 1. 成分靶点和疾病靶点交集韦恩图

2.2. 成分 - 靶点网络

将石上柏所得 17 个有效成分对应靶点建立网络表和属性表，利用 Cytoscape3.7.2 软件分别设置节点和属性，构建成分 - 靶点网络图(见图 2)。其中三角形代表有效成分，正方形代表靶点蛋白，借助 Network

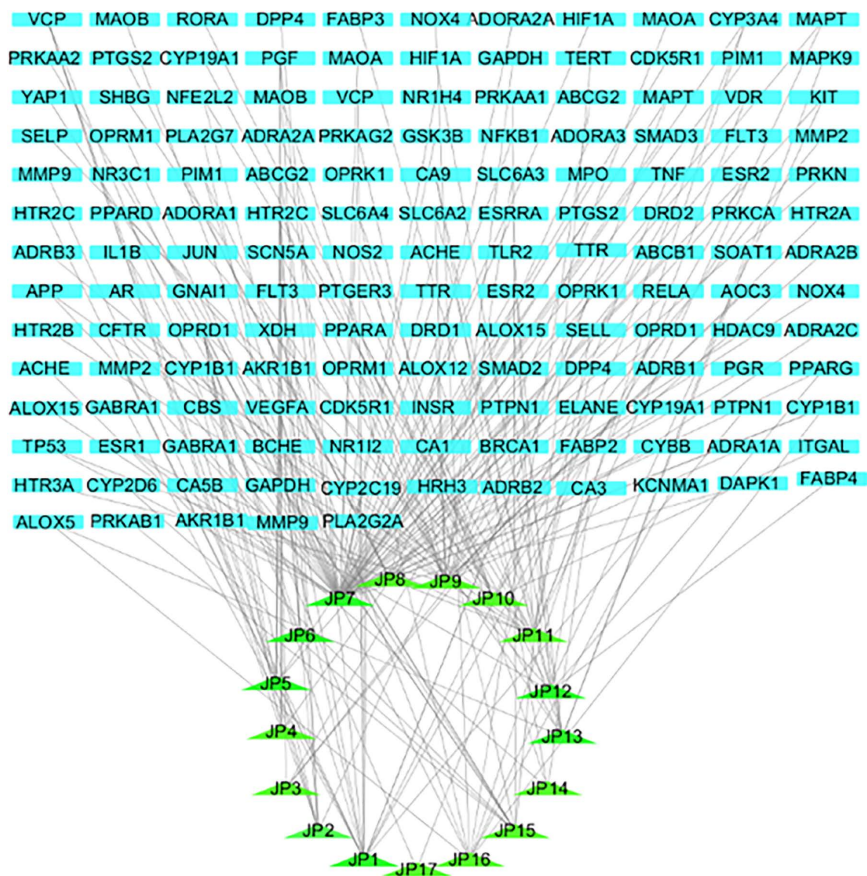


Figure 2. Active ingredients corresponding to disease target network; note: the triangle represents the compound, and the rectangle represents the target protein

图 2. 有效成分对应疾病靶点网络; 注: 三角形代表化合物, 长方形代表靶点蛋白

analysis 对网络图进行分析, 可得到一系列网络参数, 通过对成分度值(degree)统计建立表格(见表 2)。从表中可得出度值排名靠前的化合物有芹菜素、大麦芽碱、穗花杉双黄酮等, 度值排名靠前的靶点蛋白为 PTPN1、VEGFA、HTR2C 等, 且一种化合物对应多个靶点, 多个靶点共同作用于一个成分。

Table 2. Composition value table

表 2. 成分度值表

序号	PubChem ID	化合物	Degree
JP1	5281600	穗花杉双黄酮	16
JP2	5320644	罗汉松双黄酮 A	8
JP3	5281694	罗伯斯塔双黄酮	4
JP4	5271805	银杏双黄酮	6
JP5	5318569	异银杏双黄酮	7
JP6	15559724	橡胶树双黄酮	4
JP7	5280443	芹菜素	59
JP8	5281607	扁柏双黄酮	9
JP9	68313	大麦芽碱	25
JP10	8742	莽草酸	9
JP11	370	没食子酸	15
JP12	985	棕榈酸	8
JP13	443028	鹅掌楸树脂酚 B 二甲醚	10
JP14	10742	丁香酸	4
JP15	2353	小檗碱	11
JP16	72344	川陈皮素	10
JP17	68079	异回芹内酯	2

2.3. 交集靶点 PPI 网络

将有效成分对应疾病靶点删除重复选项后上传至 String 数据库, 选择 medium confidence 为 0.4, 得到 120 个交集靶点之间互作关系图(见图 3)。根据网络图得出 120 个节点和 1045 条边, 且平均度值为 17.4, 平均局部聚类系数为 0.516。将 PPI 网络图导入 Cytoscape3.7.2 软件, 作出靶蛋白之间更为直观的网络拓扑分析, 根据靶点与靶点之间的度值, 为其设置不同颜色(见图 4), 红色代表度值排名靠前, 这些蛋白可能在治疗心肌缺血方面发挥较大的作用。

2.4. GO 和 KEGG 富集分析

借助 Metascape 在线工具对靶点进行 GO 和 KEGG 富集分析。将 120 个交集靶点导入 Metascape, 选择研究对象为人类, 依次进行富集分析。以 P 值 < 0.05 作为筛选条件, 将前二十条分析条目整理成表(见表 3~6)。以表中数据作富集分析图(见图 5~8)。图 5、图 6、图 7 为 GO 分析的生物功能、细胞组分和分子功能, 图 8 为 KEGG 通路。从富集结果和作图情况显示, 生物过程得到 1740 条, 主要涉及生物途径 MAPK 级联反应的调控、细胞对氮化合物的反应等; 细胞组分得到 93 套, 作用靶点主要分布于膜、膜微区等; 分子功能得到 161 条, 主要有受体、酶、转录因子参与。

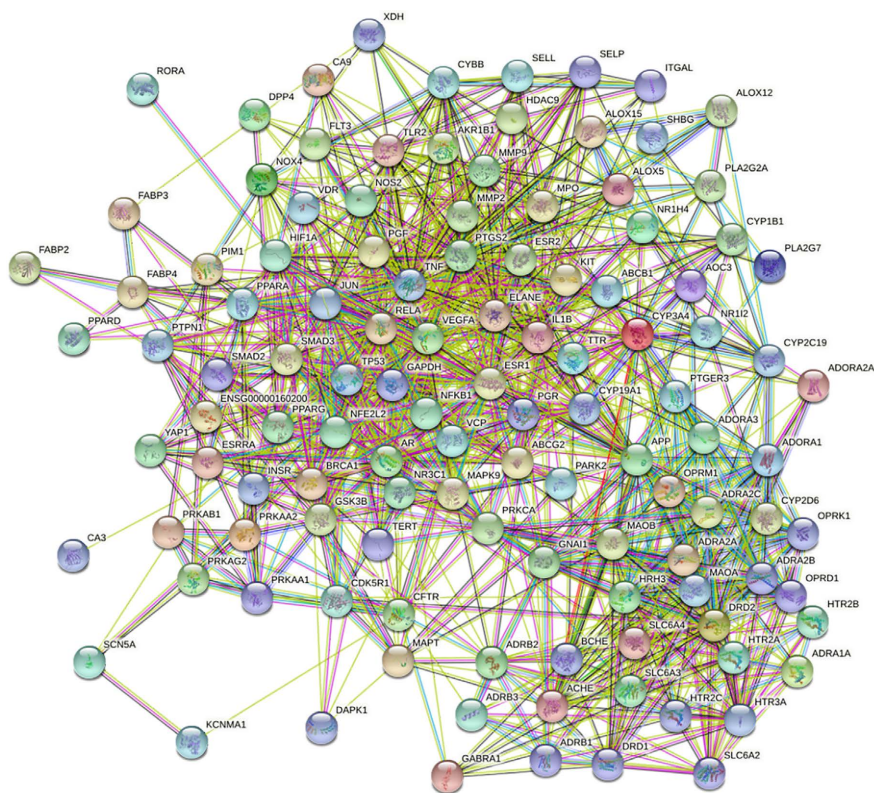


Figure 3. StringPPI network diagram
图 3. StringPPI 网络图

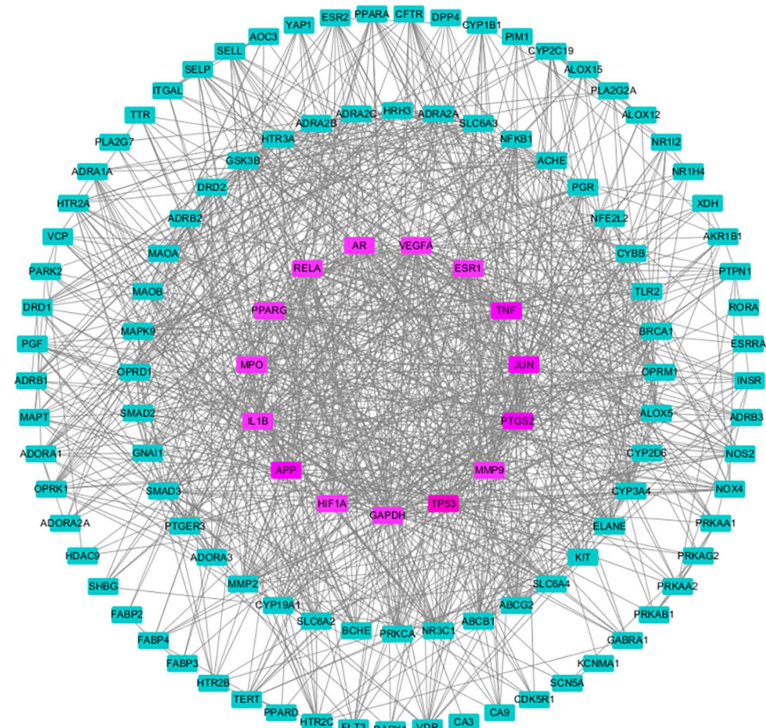


Figure 4. PPI network target interaction relationship diagram
图 4. PPI 网络靶点互作关系图

Table 3. Biological pathway enrichment table
表 3. 生物途径富集表

Term	Count	Pvalue
positive regulation of MAPK cascade	29	2.22207E-23
organic hydroxy compound metabolic process	29	2.22207E-23
cellular response to lipid	29	1.16E-22
cellular response to nitrogen compound	30	2.3474E-22
response to oxygen levels	25	3.35018E-22
circulatory system process	28	4.20522E-22
response to hypoxia	24	6.44736E-22
regulation of neurotransmitter levels	24	9.5323E-22
response to decreased oxygen levels	24	1.3996E-21
signal release	26	1.74879E-21
reactive oxygen species metabolic process	22	2.13051E-21
cellular response to organonitrogen compound	28	3.20213E-21
G protein-coupled receptor signaling pathway	21	7.37975E-21
regulation of MAPK cascade	30	9.21535E-21
regulation of protein transport	28	2.17174E-20
regulation of small molecule metabolic process	25	3.75405E-20
regulation of tube diameter	17	5.01767E-20
regulation of blood vessel size	17	5.01767E-20
regulation of blood vessel diameter	17	5.01767E-20
vascular process in circulatory system	18	5.45284E-20

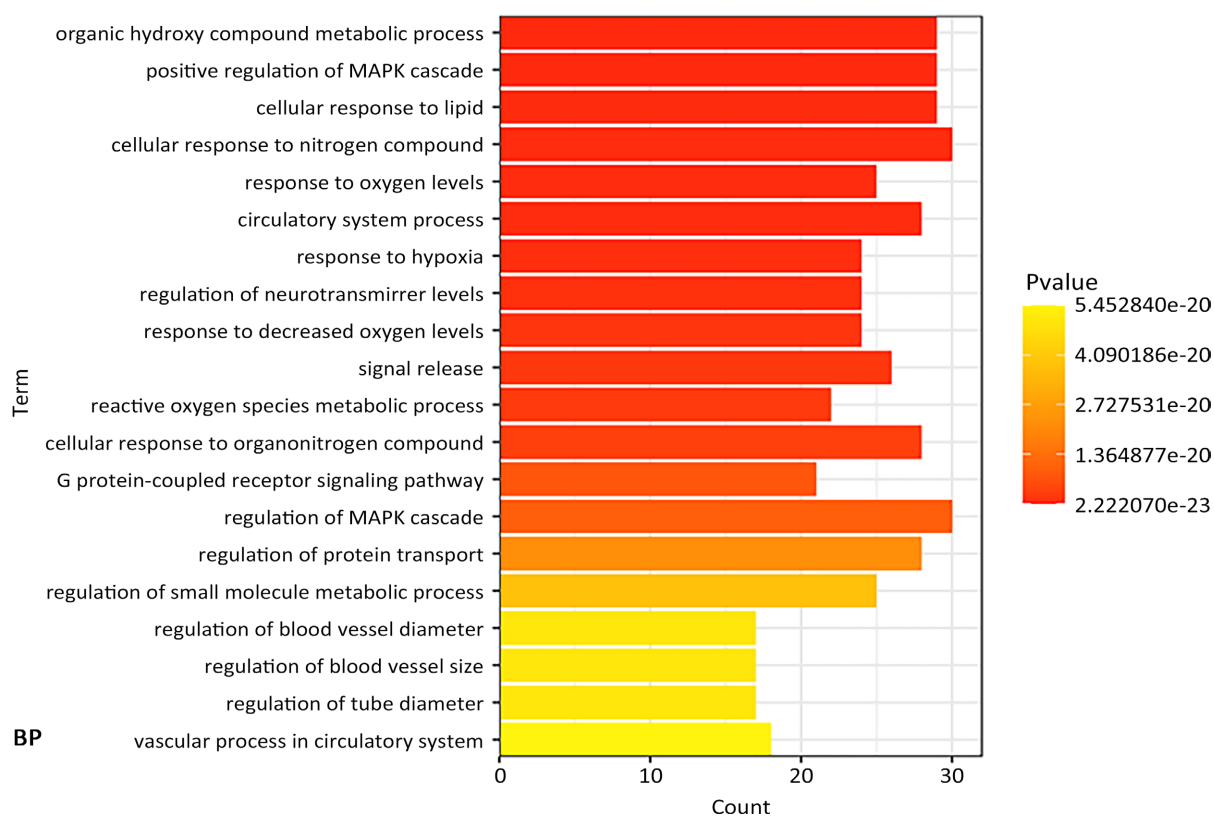


Figure 5. GO enrichment analysis (BP: biological pathway)

图 5. GO 富集分析(BP: 生物途径)

KEGG 富集通路共 286 条，其中涉及疾病相关通路有动脉粥样硬化、糖尿病并发症中的 AGE-RAGE 信号通路、神经活性配体 - 受体相互作用、钙信号传导途径、cAMP 信号通路和 HIF-1 信号通路等。从四个方面对基因进行富集分析，可发现多个基因共同发挥作用，通过不同的生物途径、参与不同的酶或受体，作用于不同的信号通路，从而发挥治疗疾病的作用。

Table 4. Cell component enrichment table

表 4. 细胞组分富集表

Term	Count	Pvalue
membrane raft	18	4.7E-15
membrane microdomain	18	4.95E-15
intrinsic component of postsynaptic membrane	13	6.28E-15
membrane region	18	9.61E-15
presynaptic membrane	12	3.67E-12
cell body	17	6.82E-10
axon	17	2.42E-09
neuron projection membrane	7	8.03E-09
receptor complex	14	5.17E-08
perinuclear region of cytoplasm	15	5.51E-07
plasma membrane raft	7	6.28E-07
nuclear transcription factor complex	8	8.81E-07
nuclear envelope	11	6.34E-06
nuclear envelope lumen	3	9.02E-06
axolemma	3	3.37E-05
axon part	9	6.59E-05
protein kinase complex	5	8.72E-05
cytoplasmic vesicle lumen	8	0.00011
vesicle lumen	8	0.000113
cytoplasmic vesicle membrane	10	0.002045

Table 5. Molecular function enrichment table

表 5. 分子功能富集表

Term	Count	Pvalue
nuclear receptor activity	13	4.66231E-20
G protein-coupled amine receptor activity	11	2.31581E-16
catecholamine binding	8	2.64314E-16
lipid binding	26	4.05731E-16
transcription factor binding	24	4.06531E-16
adrenergic receptor activity	7	7.96079E-16

Continued

transcription coactivator binding	9	3.35519E-15
transcription cofactor binding	10	1.57482E-14
protein domain specific binding	22	3.88449E-13
ammonium ion binding	10	4.56775E-13
neurotransmitter receptor activity	11	2.75152E-12
protease binding	11	1.8922E-11
heme binding	11	2.04874E-11
tetrapyrrole binding	11	4.38984E-11
neurotransmitter binding	8	5.78495E-11
oxidoreductase activity	20	7.95948E-11
ubiquitin protein ligase binding	13	5.27618E-10
serotonin binding	5	1.02893E-09
ubiquitin-like protein ligase binding	13	1.12201E-09
long-chain fatty acid binding	5	3.86143E-09

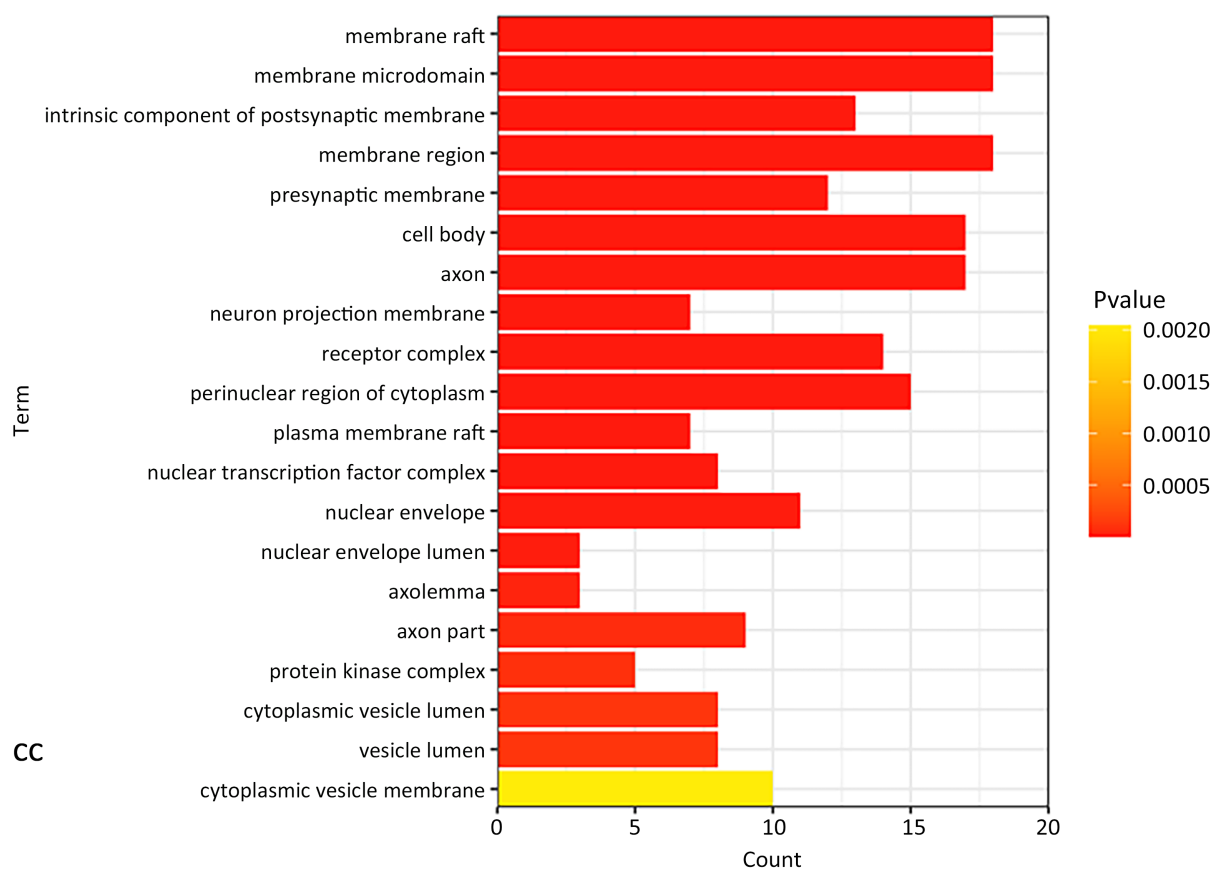


Figure 6. GO enrichment analysis (CC: cell component)

图 6. GO 富集分析(CC: 细胞组分)

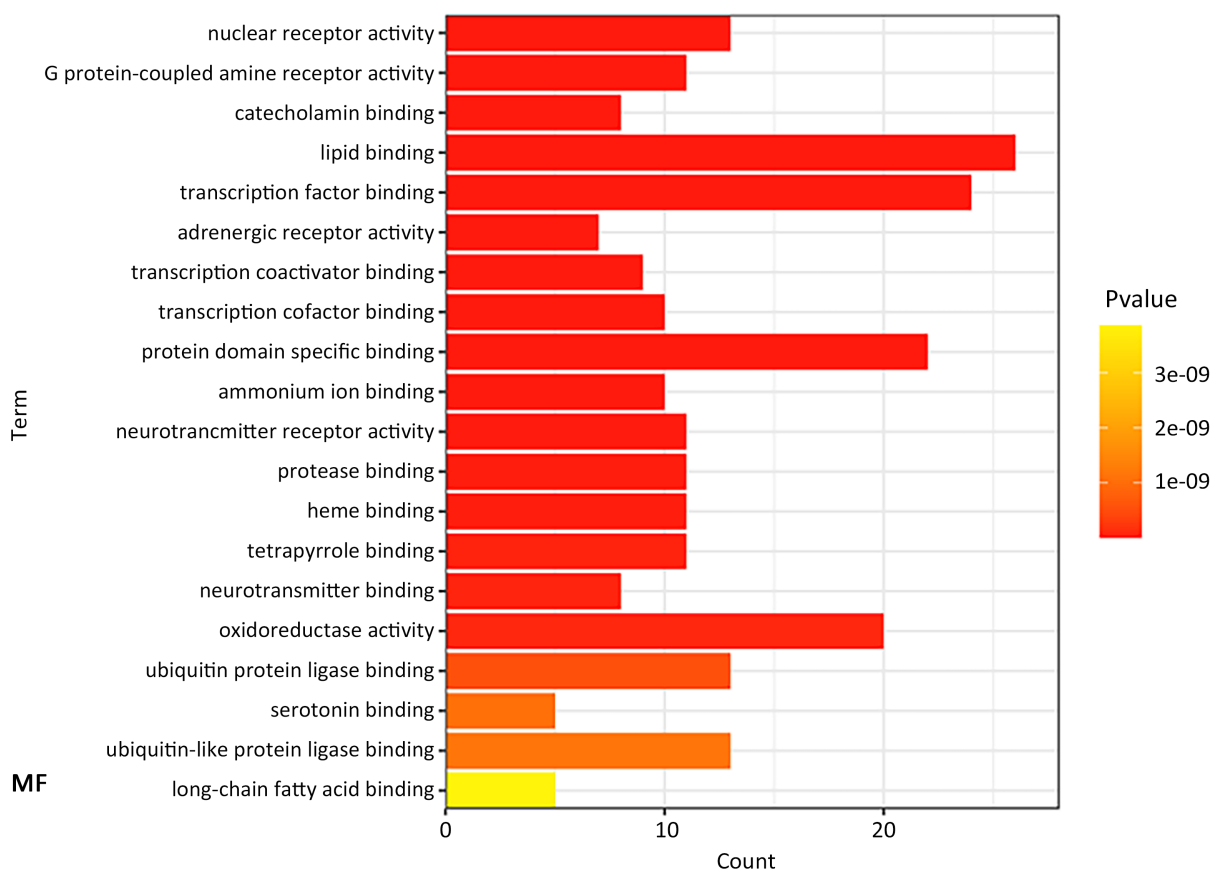


Figure 7. GO enrichment analysis (MF: molecular function)

图 7. GO 富集分析(MF: 分子功能)

Table 6. Enrichment table of KEGG pathway

表 6. KEGG 通路富集表

Term	Count	Pvalue
Neuroactive ligand-receptor interaction	22	9.07775E-22
AGE-RAGE signaling pathway in diabetic complications	14	2.82127E-17
Fluid shear stress and atherosclerosis	14	1.6426E-15
Non-alcoholic fatty liver disease	14	1.90333E-14
cAMP signaling pathway	15	5.65367E-14
cGMP-PKG signaling pathway	13	2.78556E-13
Inflammatory bowel disease	9	9.4159E-12
Adipocytokine signaling pathway	9	1.64559E-11
Calcium signaling pathway	12	2.26665E-11
IL-17 signaling pathway	9	2.56325E-10
HIF-1 signaling pathway	9	2.34888E-09
TNF signaling pathway	8	2.21697E-08
AMPK signaling pathway	8	5.07055E-08
inflammatory mediator regulation of trp channels	7	3.35772E-07

Continued

Toll-like receptor signaling pathway	7	3.35772E-07
NOD-like receptor signaling pathway	7	8.99714E-06
Drug metabolism-cytochrome P450	5	1.28935E-05
Glycine, serine and threonine metabolism	4	2.60439E-05
Adrenergic signaling in cardiomyocytes	6	3.76567E-05
NF-kappa B signaling pathway	5	5.66793E-05

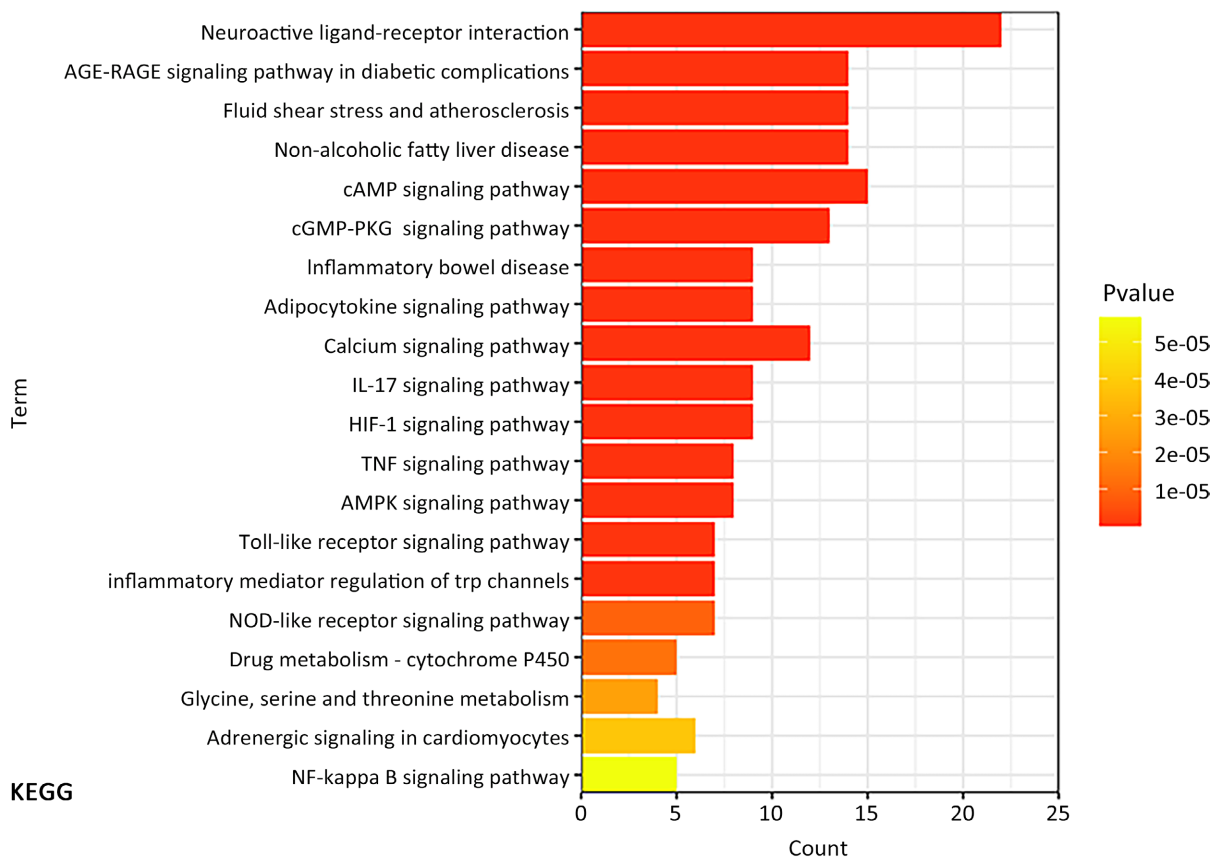


Figure 8. KEGG enrichment analysis

图 8. KEGG 富集分析

3. 讨论

本实验借助网络药理学的方法，通过系列分析平台和数据库，系统筛选石上柏中可能对心肌缺血相关疾病有治疗作用的成分和作用机制。根据研究结果显示，石上柏中筛选的有效成分可能对心肌缺血有治疗作用，如穗花杉双黄酮、芹菜素、没食子酸等。E.R. Woo 等[20]发现以穗花杉双黄酮浓度依赖对核因子-B(NF-B)介导的一氧化氮合酶(iNOS)基因的影响，穗花杉双黄酮浓度以依赖的方式抑制脂多糖所导致的鼠性 RAW 264.7 细胞诱导型一氧化氮合酶的表达，抑制一氧化氮的产生，从而发挥抗炎作用；也可以显著下调 COX-2 蛋白表达水平，抑制前列腺素 E2 的合成，从而发挥抗炎作用[21]，治疗心肌缺血疾病。芹菜素可以缩短大鼠再灌注心律失常持续时间，减少细胞凋亡率，缩小心肌梗死面积，且作用于细胞凋亡机制与下调心肌 Bax、Caspase-3 和上调 Bcl-2 的表达有关，从而起到抗心肌缺血作用[22]。Chiu-Mei

Lin 等[23]在研究没食子酸经体内体外在缺氧诱导应激下的心脏保护作用,结果显示没食子酸可能是通过上调 miR-145、Wnt3a 和 β -连环蛋白的表达、下调 Dab2 蛋白表达,通过 miR-145 和 Dab2/Wnt3a/ β -catenin 途径介导,达到保护心肌细胞的效果。目前,已有部分有效成分被报道有抗心肌缺血的药理作用,但本研究中还有许多有效化合物未见报道且具有深入研究的价值。

蛋白互作 PPI 网络图显示 GAPDH、VEGFA、TNF、APP、TP53、PTGS2、JUN、IL1B、RELA、MMP9、HIF1A 等自由度值较大,推测在石上柏治疗心肌缺血中彼此组合联系共同发挥协同作用。血管内皮生长因子 VEGFA 可以促进血管再生,缩小心肌缺血导致心肌损伤的范围和提高心肌细胞对缺氧的耐受性,改善心肌功能[24]。TNF- α 的形成和释放及其下游信号转导级联被表征,与动脉粥样硬化、心肌缺血/再灌注损伤和心力衰竭的发病机制和进展密切相关, TNF- α 对心血管疾病进展有着矛盾作用且有剂量依赖性,高浓度时会与有关受体结合加重细胞损伤程度,低浓度时发挥保护作用[25]。Zhen-Wei Ge 等探究 miR-26b 基因影响炎症反应和心肌重塑的实验中,miR-26b 可以靶向 PTGS2 以介导 MAPK 途径,改善心肌缺血引起的心肌梗死症状,则 PTGS2 可能与治疗心肌缺血有相关作用[26]。转录因子 AP-1 (JUN) 是亮氨酸拉链蛋白家族,许多因素可以通过激活丝裂原激活蛋白激酶(MAPK)级联,使不同的底物磷酸化来提高 AP-1 的活性,从而影响心血管疾病[27]。

GO 富集分析结果显示石上柏抗心肌缺血涉及生物途径有 MAPK 级联反应的调控、细胞对氮化合物的反应等;作用靶点主要分布于膜、膜微区等;分子功能分析中有受体、酶、转录因子参与,共同发挥作用。而 KEGG 通路分析中,主要涉及的通路有糖尿病并发症中的 AGE-RAGE 信号通路、神经活性配体-受体相互作用、钙信号传导途径、cAMP 信号通路和 HIF-1 信号通路等。各个通路中有多个靶点蛋白共同参与调控信号通路,从而对疾病产生作用。动脉粥样硬化是多因素参与的炎性过程,血管内皮的损伤可能导致其发生,而富集分析中通路显示多个基因参与了调控,有 MMP2、MMP9、NFKB1、RELA、TNF、VEGFA 等。Wagsäte 等[28]在研究 MMPs 在动脉粥样硬化中的表达情况结果中, MMP2 的表达和活性均增加, MMP9 蛋白也能在其晚期病变时明显增强弹性蛋白的降解,同时诱导斑块破坏[29]。心肌缺血再灌注损伤引起心肌细胞缺氧达到一定时间,使细胞内代谢异常,导致胞外的 Ca^{2+} 转运至胞内,胞内钙离子浓度增加,钙稳态被破坏,加重心肌缺血损伤[30],通过调控钙信号通路,可以改善心肌缺血疾病。王茜等[31]发现 cAMP 信号分子可通过下调凋亡因子参与保护作用。HIF-1 信号通路在治疗心肌缺血方面也发挥不可缺少的作用,杨龙等[32]研究中表明药物可以调控 HIF-1 在内的信号通路从而促进线粒体自噬,减轻心肌细胞缺氧复氧的损伤; AGE-RAGE 信号通路主要与炎症性因子有关, AGEs 与其 RAGE 的结合,可以调控 NF- κ B mRNA 的表达,导致其控制的基因影响组织损伤和微循环障碍[33],也可通过该信号通路治疗心血管疾病。

本研究采用网络药理学的方法对石上柏抗心肌缺血的物质基础和作用机制进行探究,借助软件和分析平台,筛选得到石上柏中双黄酮类如穗花杉双黄酮、芹菜素、大麦芽碱、没食子酸等可能对心肌缺血疾病有一定的治疗作用,根据富集分析结果,这些成分可能通过不同的生物途径,多种辅助因子和酶等参与协调,作用于复杂的信号通路,来发挥抗心肌缺血作用。但这项研究是在数据分析的基础上进行的,因此仍需进一步的实验验证我们的发现。

基金项目

国家自然科学基金(NO:81302639),贵州省中医药管理局项目(NO:D-449),遵市科人才团队项目(2020)10号。

参考文献

- [1] Ambrose, J.A. (2006) Myocardial Ischemia and Infarction. *Journal of the American College of Cardiology*, **47**, D13-D17.

<https://doi.org/10.1016/j.jacc.2006.04.013>

- [2] 张丽娜. 《黄帝内经》心痹心痛与冠心病心绞痛相关性及中药治疗的探讨[D]: [硕士学位论文]. 哈尔滨: 黑龙江中医药大学, 2006.
- [3] 张玲. 中药防治心肌缺血损伤作用机制研究进展[J]. 辽宁中医杂志, 2010, 37(10): 2070-2072.
- [4] 王恒, 孙宝飞, 吉杨丹, 余跃生, 臧贵勇, 陈明, 梁景岩. 苗药狭叶崖爬藤对大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用[J]. 辽宁中医杂志, 2017, 44(12): 2649-2651.
- [5] Xue, Y., Jin, W., Xue, Y., Zhang, Y., Wang, H., Zhang, Y., Guan, S., Chu, X. and Zhang, J. (2020) Safranal, an Active Constituent of Saffron, Ameliorates Myocardial Ischemia via Reduction of Oxidative Stress and Regulation of Ca²⁺ Homeostasis. *Journal of Pharmacological Sciences*, **143**, 156-164. <https://doi.org/10.1016/j.jphs.2020.03.005>
- [6] 中国科学院中国植物志编委会. 中国植物志[M]. 北京: 科学出版社, 2004, 98(15): 87-90.
- [7] 吴世福. 湖南卷柏属 *Selaginella* Spring 资料[J]. 上海师范大学学报(自然科学版), 2004, 33(2): 83-94.
- [8] Kim, G.L., Jang, E.H., Lee, D.E., Bang, C., Kang, H., Kim, S.H., *et al.* (2020) Amentoflavone, Active Compound of *Selaginella tamariscina*, Inhibits *in Vitro* and *in Vivo* TGF- β -Induced Metastasis of Human Cancer Cells. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **687**, Article ID: 108384. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2020.108384>
- [9] 王刚, 才谦, 李三华. 石上柏双黄酮类和酚酸类成分体外抗氧化和抗肿瘤活性研究[J]. 辽宁中医药大学学报, 2018, 20(7): 5-8.
- [10] Cheng, J., Kondo, K. and Suzuki, Y. (2003) Inhibitory Effects of Total-Flavones of *Hippophae rhamnoides* L on Thrombosis in Mouse Femoral Artery and *in Vitro* Platelet Aggregation. *Life Sciences*, **72**, 2263-2267. [https://doi.org/10.1016/S0024-3205\(03\)00114-0](https://doi.org/10.1016/S0024-3205(03)00114-0)
- [11] 杨艺, 王冬梅, 刘毅. 基于网络药理学探索附子理中汤治疗溃疡性结肠炎的作用机制[J]. 中医学, 2021, 10(5): 593-608.
- [12] Ru, J., Li, P., Wang, J., Zhou, W., Li, B., Huang, C., *et al.* (2014) TCMSP: A Database of Systems Pharmacology for Drug Discovery from Herbal Medicines. *Journal of Cheminformatics*, **6**, Article No. 13. <https://doi.org/10.1186/1758-2946-6-13>
- [13] Kim, S., Chen, J., Cheng, T., Gindulyte, A., He, J., He, S., *et al.* (2019) PubChem 2019 Update: Improved Access to Chemical Data. *Nucleic Acids Research*, **47**, 1102-1109. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1033>
- [14] Daina, A., Michielin, O., Zoete, V. (2019) Swiss Target Prediction: Updated Data and New Features for Efficient Prediction of Protein Targets of Small Molecules. *Nucleic Acids Research*, **47**, W357-W364. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz382>
- [15] Rappaport, N., Fishilevich, S., Nudel, R., *et al.* (2017) Rational Confederation of Genes and Diseases: NGS Interpretation via GeneCards, MalaCards, and VarElect. *Biomedical Engineering Online*, **16**, Article No. 72. <https://doi.org/10.1186/s12938-017-0359-2>
- [16] Consortium, U.P. (2020) UniProt: The Universal Protein Knowledgebase in 2021. *Nucleic Acids Research*, No. D1, 1-3.
- [17] Shannon, P., Markiel, A., Ozier, O., Baliga, N.S., Wang, J.T., Ramage, D., *et al.* (2003) Cytoscape: A Software Environment for Integrated Models of Biomolecular Interaction Networks. *Genome Research*, **13**, 2498-2504. <https://doi.org/10.1101/gr.1239303>
- [18] Szklarczyk, D., Gable, A.L., Lyon, D., Junge, A., Wyder, S., Huerta-Cepas, J., *et al.* (2018) STRING v11: Protein-Protein Association Networks with Increased Coverage, Supporting Functional Discovery in Genome Wide Experimental Datasets. *Nucleic Acids Research*, **47**, D607-D613. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1131>
- [19] Liu, S.C. and Wang, G.Y. (2018) Bioinformatic Analysis Reveals CYP2C9 as a Potential Prognostic Marker for HCC and Liver Cancer cell Lines Suitable for Its Mechanism Study. *Cellular and Molecular Biology*, **64**, 70-74. <https://doi.org/10.14715/cmb/2018.64.7.12>
- [20] Woo, E.R., Lee, J.Y., Cho, I.J., Kim, S.G. and Kang, K.W. (2005) Amentoflavone Inhibits the Induction of Nitric Oxide Synthase by Inhibiting NF-kappaB Activation in Macrophages. *Pharmacological Research*, **51**, 539-546. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2005.02.002>
- [21] Banerjee, T., Vliet, A., Ziboh, V.A. (2002) Downregulation of COX-2 and iNOS by Amentoflavone and Quercetin in A549 Human Lung Adenocarcinoma Cell Line. *Prostaglandins, Leukotrienes & Essential Fatty Acids*, **66**, 485-492. <https://doi.org/10.1054/plaf.2002.0387>
- [22] 史婷婷. 芹菜素对大鼠心肌缺血再灌注细胞凋亡的保护作用[D]: [硕士学位论文]. 太原: 山西医科大学, 2011.
- [23] Lin, C.M., Fang, W.J., Wang, B.W., Pan, C.M., Chua, S.K., Hou, S.W. and Shyu, K.G. (2020) (-)-Epigallocatechin Gallate Promotes MicroRNA 145 Expression against Myocardial Hypoxic Injury through Dab2/Wnt3a/ β -Catenin.

- American Journal of Chinese Medicine*, **48**, 341-356. <https://doi.org/10.1142/S0192415X20500172>
- [24] Follin, B., Tratwal, J., Haack-Sørensen, M., Elberg, J.J., Kastrup, J. and Ekblond, A. (2013) Identical Effects of VEGF and Serum-Deprivation on Phenotype and Function of Adiposederived Stromal Cells from Healthy Donors and Patients with Ischemic Heart Disease. *Journal of Translational Medicine*, **11**, Article No. 219. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-11-219>
- [25] Kleinbongard, P., Heusch, G. and Schulz, R. (2010) TNF-Alpha in Atherosclerosis, Myocardial Ischemia/Reperfusion and Heart Failure. *Pharmacology & Therapeutics*, **127**, 295-314. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2010.05.002>
- [26] Ge, Z.W., Zhu, X.L., Wang, B.C., Hu, J.-L., Sun, J.-J., Wang, S., *et al.* (2019) MicroRNA-26b Relieves Inflammatory Response and Myocardial Remodeling of Mice with Myocardial Infarction by Suppression of MAPK Pathway through Binding to PTGS2. *International Journal of Cardiology*, **15**, 23-25. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2018.12.077>
- [27] 张震, 惠汝太. 转录因子 AP-1 与心血管疾病[J]. 中国分子心脏病学杂志, 2003, 3(4): 198-201.
- [28] Wagsater, D., Zhu, C.Y., Bjorkegren, J., Skogsberg, J. and Eriksson, P. (2011) MMP-2 and MMP-9 Are Prominent Matrix Metalloproteinases during Atherosclerosis Development in the Ldlr(-/-)Apob100/100 Mouse. *International Journal of Molecular Medicine*, **28**, 247-253. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2011.693>
- [29] Gough, P.J., Gomez, I.G., Wille, P.T. and Raines, E.W. (2006) Macrophage Expression of Active MMP-9 Induces Acute plaque disruption in apoE-deficient mice. *Journal of Clinical Investigation*, **116**, 59-69. <https://doi.org/10.1172/JCI25074>
- [30] Kandula, V., Kosuru, R., Li, H., Yan, D., Zhu, Q., Lian, Q., *et al.* (2016) Forkhead Box Transcription Factor 1: Role in the Pathogenesis of Diabetic Cardiomyopathy. *Cardiovascular Diabetology*, **15**, Article No. 44. <https://doi.org/10.1186/s12933-016-0361-1>
- [31] 王茜, 邓凤君, 林焕冰, 等. AMP 信号分子在缺血后适应心肌保护机制中的作用[J]. 中国病理生理杂志, 2011, 27(8): 1496-1501.
- [32] 杨龙. HIF-1 调控线粒体自噬恢复七氟醚后处理减轻糖尿病心肌缺血再灌注损伤的机制研究[D]: [博士学位论文]. 乌鲁木齐: 新疆医科大学, 2020.
- [33] 张涛, 耿壮, 刘方超, 等. 人脐带间充质干细胞对 1 型糖尿病小鼠皮肤组织 AGEs/RAGE/NF-κB 信号通路影响的研究[J]. 中国糖尿病杂志, 2019, 27(3): 224-228.