

DOI:10.13288/j.11-2166/r.2023.20.014

基于网络药理学、分子对接探讨强心汤治疗慢性心力衰竭的潜在作用机制

毛美玲¹, 卢健棋²✉, 谢丽钰¹, 庞延², 张鼎¹, 石炜琦¹, 刘水花¹, 蔡宗余¹, 张诗雨¹, 黄敏¹

1. 广西中医药大学, 广西壮族自治区南宁市青秀区五合大道13号仙葫校区, 530200; 2. 广西中医药大学第一附属医院

[摘要] **目的** 基于网络药理学、分子对接的方式揭示强心汤治疗慢性心力衰竭的作用靶点和分子机制。**方法** 从TCMSP数据库检索强心汤的活性成分, 应用GeneCards、OMIM、TTD、PharmGkb、DrugBank数据库筛选慢性心力衰竭靶点, 取交集获得强心汤治疗慢性心力衰竭的交集靶点。采用STRING平台构建蛋白互作网络(PPI), Cytoscape 3.8.0软件网络拓扑计算筛选核心靶点, R 4.2.3进行GO富集分析及KEGG通路富集分析, 构建“活性成分-靶点”网络。采用AutoDock 1.5.7进行分子对接预测活性成分和核心靶点的结合性能。**结果** 筛选出强心汤治疗慢性心力衰竭的交集靶点75个, 其中核心靶点为雌激素受体1(ESR1, 度值=7)、核受体辅激活因子1(NCOA1, 度值=8)、糖皮质激素受体(NR3C1, 度值=7)、核受体辅激活因子2(NCOA2, 度值=7)。GO富集分析结果显示, 分子功能中 P 值最小的前3项有G蛋白偶联胺受体活性、突触后神经递质受体活性、神经递质受体活性($P<0.01$); 生物过程中 P 值最小的前3项有腺苷酸环化酶激活肾上腺素受体信号通路、肾上腺素受体信号通路、腺苷酸环化酶调节G蛋白偶联受体信号通路($P<0.01$); 细胞组成中 P 值最小的前3项为突触后膜、突触膜、突触前膜的组成部分($P<0.01$)。KEGG富集分析显示, 关键信号通路前5位的为神经活性配体-受体的相互作用、钙信号通路、多巴胺能突触、可卡因成瘾、环状磷酸鸟苷-蛋白激酶G(cGMP-PKG)信号通路。分子对接结果显示, 木犀草素、异黄酮与4个核心靶点(ESR1、NCOA1、NR3C1、NCOA2)的结合能更低, 结构更稳定。**结论** 强心汤治疗慢性心力衰竭与神经活性配体-受体的相互作用、钙信号通路、多巴胺能突触、化学致癌-受体激活、cGMP-PKG信号通路、脂质和动脉粥样硬化、cAMP信号通路等通路相关, 木犀草素、异黄酮可能是其治疗慢性心力衰竭的核心活性化合物。**[关键词]** 慢性心力衰竭; 强心汤; 网络药理学; 分子对接; 核心靶点

慢性心力衰竭(chronic heart failure, CHF)是多种心血管系统疾病的终末阶段, 近年来其死亡率和复发率呈上升趋势^[1]。随着社会发展、经济负担加重和心理压力过大等因素影响, 发病人群趋于年轻化^[2]。强心汤是我们治疗CHF的临床经验方, 前期临床观察发现, 该方能够改善患者的生存质量和患者运动耐量, 提高心功能^[3-4]。中药复方治疗疾病常涉及多靶点、多组分和多通路, 因此对其具

体治疗机制、有效成分和作用靶点等的研究就需要借助更为系统、科学、可行、可信的方法和工具。网络药理学集合生物学、药理学和计算机信息网络等多学科多系统理论和手段, 可探索疾病复杂的分子化合物、靶点蛋白、作用途径, 并用以分析、预测药物的作用机制^[5]。分子对接是基于蛋白质-配体互作结构预测蛋白质功能和设计药物的一种生物分子组装工具^[6], 其已成为药物发现的重要过程^[7]。本研究采用网络药理学方法筛选出强心汤的有效成分及其与CHF的交集靶点等信息, 通过分子对接的方法验证核心靶点与主要有效成分的对接情况, 探讨强心汤治疗CHF的潜在作用机制。

基金项目: 国家自然科学基金(82160887, 81673891); 广西自然科学基金(2021GXNSFAA220111, 2021GXNSFBA196018); 广西中医药大学2023年研究生教育创新计划(YCBXJ2023024)

✉ 通讯作者: lujianqi666@163.com

1 网络药理学研究方法

1.1 强心汤有效成分和靶点的筛选

强心汤的组成为黄芪、党参、炮附片、桂枝、川芎、丹参、葶苈子、茯苓、白术、柏子仁、玉竹、炙甘草。将强心汤中每味中药逐个输入到 TCMSD 数据库 (<https://old.tcmsp-e.com/tcmsp.php>) 中, 在口服生物利用度 (OB) $\geq 30\%$ 、类药性 (DL) ≥ 0.18 的设置条件下, 获得中药的有效成分和相对应靶点, 并进一步将所得靶点导入 Uniprot (<https://www.UniProt.org/>), 以获得相应的基因符号。

1.2 CHF 相关靶点筛选

以“chronic heart failure”为检索词, 在人类数据库 Genecards (<https://www.genecards.org/>)、OMIM (<https://omim.org/>)、TTD (<https://db.idrblab.net/ttd/>)、DrugBank (<https://www.drugbank.com/>)、PharmGkb (<https://www.pharmgkb.org/>) 中查找, 获得疾病靶点后合并取交集, 获得疾病 5 个数据库靶点。

1.3 “药物-有效成分-疾病靶点”网络构建

使用在线工具 Draw Venn Diagram (<https://www.mydraw.com/venn-diagram/>) 取强心汤靶点基因与 CHF 靶点基因的交集。

1.4 蛋白互作网络的构建和分析

将强心汤靶点基因与 CHF 靶点基因的交集筛选出的靶点输入到 STRING 数据库 (<https://cn.string-db.org/>), 设定“Homo sapiens”的生物种类, 最小互作阈值设为“medium confidence” (> 0.9), 保存蛋白互作网络 (PPI) 和 TSV 格式的数据文件, 将此文件导入 Cytoscape 3.8.0 软件, 绘制 PPI 网络图, 并根据度值确定核心蛋白。

1.5 基因本体 (GO) 富集与京都基因和基因组百科全书 (KEGG) 通路分析

将疾病-药物交集靶点基因通过 David 数据库 (<https://david.ncifcrf.gov/>) 收集, 物种选择“智人”进行 GO 和 KEGG 信号通路富集分析, 然后将数据结果导入 R 语言软件 (R 4.2.3), 进行可视化分析, 最终得到与 CHF 密切相关的信号通路图。

2 分子对接验证方法

2.1 准备小分子配体和蛋白受体文件

通过蛋白质数据库 (PDB) (<http://www.rcsb.org/>) 查找蛋白互作网络的构建和分析中得到的核心蛋白, 并保存其 3D 结构的 PDB 格式文件; 将有效成分中度值排名前三的小分子通过 PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) 数据库下载

其 2D 结构。随后将得到的蛋白和小分子逐一导入 AutoDock 1.5.7 软件中, 去除水分子, 并加氢, 最终保存为 PDBQT 格式文件。

2.2 制备对接活性口袋

将上一步所得的 PDBQT 文件导入 AutoDock 1.5.7 软件, 将分子对接范围设定为最大值 1.000, 并将中心坐标值 (x/y/z) 输入到 vina 脚本中, 进一步得到最小结合能。

2.3 制作可视化对接图

选择最小结合能配体文件和蛋白受体共同导入 PyMOL 2.4.0 软件中, 一次结合可得到 20 张分子对接图, 挑选最清楚的一张作为最终的展示图。

3 网络药理学研究结果

3.1 强心汤中主要生物活性成分筛选结果

从 TCMSD 网站上检索并在 OB $\geq 30\%$ 、DL ≥ 0.18 的条件下, 检索获得强心汤组成药物的主要活性成分和相对应靶点, 并进一步将所得靶点导入 Uniprot 网站转化为相应的基因符号。经过检索共得主要活性成分: 黄芪 15 个, 党参 16 个, 炮附片 6 个, 桂枝 6 个, 川芎 6 个, 丹参 8 个, 葶苈子 9 个, 茯苓 5 个, 白术 3 个, 柏子仁 5 个, 玉竹 3 个, 甘草 89 个。

3.2 CHF 相关靶点筛选结果

从 Genecards、OMIM、TTD、DrugBank、PharmGkb 数据库中分别得到 10 478、176、13、12、16 个疾病靶点, 除去重复靶点后, 得到共 10 513 个基因靶点。

3.3 “药物-有效成分-疾病靶点”网络的构建与分析结果

将药物治疗靶点和疾病作用靶点取交集后, 可以看到强心汤与慢性心力衰竭存在 75 个交集基因靶点: NOS2、PTGS1、AR、SCN5A、PTGS2、ESR2、DPP4、HSP90AA1、CDK2、CHEK1、PRSS1、NCOA2、CAMTA2、PGR、CHRM3、CHRM1、CHRM2、ADRA1B、GABRA1、GRIA2、IGHG1、ADH1B、ADH1C、RXRA、SLC6A2、ESR1、PPARG、MAPK14、GSK3B、CCNA2、PYGM、PPARD、AKR1B1、NCOA1、F7、ACHE、MAOB、ADRB1、HTR3A、ADRA2C、ADRB2、ADRA1D、OPRM1、DRD1、KCNH2、CHRM5、CHRM4、OPRD1、ADRA1A、SLC6A3、SLC6A4、RXRB、KDR、MET、MMP3、CA2、NR3C2、ADRA2A、PLAU、LTA4H、MAOA、CTRB1、TUBB1、NR3C1、CHRNA2、DPEP1、DRD2、DRD5A、DRA2B、GABRG3、GABRE、TRPV1、RXRG、

表 2 强心汤与慢性心力衰竭交集靶点的 KEGG 通路富集分析结果 (P 值最小的前 10 项)

Table 2 Results of KEGG pathway enrichment analysis of intersecting targets of Qiangxin Decoction and chronic heart failure (Top 10 with the smallest P values)

编号	通路	P 值
Hsa04080	神经活性配体-受体的相互作用	7.58×10 ⁻¹⁸
Hsa04020	钙信号通路	1.32×10 ⁻⁸
Hsa04782	多巴胺能突触	1.72×10 ⁻⁷
Hsa05030	可卡因成瘾	3.62×10 ⁻⁶
Hsa04022	cGMP-PKG 信号通路	1.26×10 ⁻⁵
Hsa05207	化学致癌-受体激活	1.30×10 ⁻⁵
Hsa04919	甲状腺激素信号通路	7.97×10 ⁻⁵
Hsa05417	脂质与动脉粥样硬化	9.25×10 ⁻⁵
Hsa04024	cAMP 信号通路	1.14×10 ⁻⁴
Hsa04970	唾液分泌	1.38×10 ⁻⁴

注: cGMP, 环磷酸鸟苷; PKG, 蛋白激酶 G; cAMP, 环磷酸腺苷。

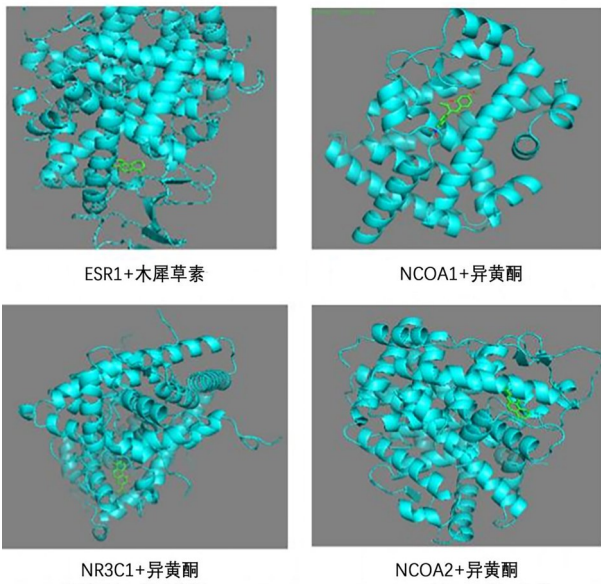
草素 (度值=37)、异黄酮 (度值=36)、4 亚甲酰亚胺 (度值=28)。将这 3 种重要有效成分 (木犀草素、异黄酮、4-亚甲酰亚胺) 作为配体, 将核心靶点 ESR1、NCOA1、NR3C1、NCOA2 作为受体, 进行对接, 先得到配体-受体的结合能, 结合能值越小表示结合能越低、构象越稳定。表 3 示, 强心汤这 3 种有效成分与核心靶点的结合能值均在 -5.0 以下, 说明结合程度高且构象稳定, 其中木犀草素、异黄酮与 4 个核心靶点 (ESR1、NCOA1、NR3C1、NCOA2) 的结合能更低, 结构更稳定, 表明木犀草素、异黄酮可能是强心汤治疗 CHF 的核心活性化合物。取结合能最低值组合用 PyMOL 2.4.0 软件制作可视化图, 如图 2 所示, ESR1 与木犀草素的结合更稳定, NCOA1、NR3C1、NCOA2 与异黄酮的结合更稳定。

表 3 强心汤 3 种重要有效成分配体和核心靶点蛋白受体结合能

Table 3 Receptor binding energies of ligands and core target proteins of the three important active ingredients of Qiangxin Decoction (Kal/mol)

有效成分	ESR1	NCOA1	NR3C1	NCOA2
木犀草素	-9.8	-7.4	-7.7	-7.2
异黄酮	-9.6	-9.5	-9.6	-8.9
4-亚甲酰亚胺	-8.4	-8.3	-8.3	-7.2

注: ESR1, 雌激素受体 1; NCOA1, 核受体辅激活因子 1; NR3C1, 糖皮质激素受体; NCOA2, 核受体辅激活因子 2。



注: ESR1, 雌激素受体 1; NCOA1, 核受体辅激活因子 1; NR3C1, 糖皮质激素受体; NCOA2, 核受体辅激活因子 2。

图 2 强心汤有效成分木犀草素、异黄酮与慢性心力衰竭核心靶点分子对接图

Figure 2 Molecular docking diagram of lignans and isoflavones, the important active ingredients of Qiangxin Decoction, with the core targets of chronic heart failure

5 讨论

中医学认为, CHF 属于“胸痹”“心悸”“水肿”“喘证”等范畴。心主血脉, 心气推动血的运行, 荣养形体官窍, 维持生命活动。一旦心气不足, 则血行无力, 形神失养, 出现疲乏无力、劳则气喘等症, 日久则气损及阳, 出现阳虚。阳气亏虚, 血行无力, 则致血瘀, 血瘀日久生水饮, 而血瘀、水饮皆属阴邪, 则致心气、心阳愈亏, 出现恶性循环, 而发为 CHF^[8]。因此, 我们认为本虚标实是 CHF 的根本病机, 本虚主要表现为气虚、阳虚, 标实主要表现在血瘀、水停。强心汤是我们治疗 CHF 的有效经验方, 方中以君药黄芪、附子补气温阳; 臣药党参、桂枝更添益气助阳之功; 佐药配以玉竹、茯苓、白术健脾养心、益气燥湿, 既能助心气行水利水又能防过利伤阴; 同时添丹参、川芎行气活血祛瘀, 通行经脉, 瘀滞则消; 柏子仁养心安神以助心藏神; 再配以葶苈子通调水道, 泻肺利水。此外, 桂枝配茯苓可温化渗利, 桂枝配炙甘草辛甘化阳, 共益心气、通心阳。炙甘草和中益气, 调和诸药以为使。诸药共奏益气温阳、活血利水之功效。临床研究发现, 强心汤联合八段锦治疗不仅能够改善老年慢性心力衰竭伴衰弱患者生存质量,

也能更好地提高心功能^[9]。

本研究收集到强心汤 82 个主要生物活性成分, 其中主要包括木犀草素、异黄酮、山柰酚、槲皮素、儿茶酚、 β -谷甾醇等, 同时筛选出 75 个与 CHF 交集的靶基因。通过 STRING 数据库构建 PPI 互作网络, 基于本研究筛选出的核心靶点数据, 根据度值 ≥ 7 确定了排名靠前的 4 个潜在关键核心治疗靶点, 分别是 ESR1、NCOA1、NR3C1 和 NCOA2。GO 富集和 KEGG 通路分析结果表明, 强心汤主要与 G 蛋白偶联胺受体活性、突触后神经递质受体活性、儿茶酚胺结合、腺苷酸环化酶激活肾上腺素受体信号通路、肾上腺素受体信号通路、腺苷酸环化酶调节 G 蛋白偶联受体信号通路、突触后膜、突触膜、突触前膜的组成部分等有关, 有效成分可能通过 CHF 中的神经活性配体-受体的相互作用、钙信号通路、多巴胺能突触、化学致癌-受体激活、cGMP-PKG 信号通路、脂质和动脉粥样硬化、cAMP 信号通路等相关途径治疗 CHF。分子对接可以在理论层面预测性研究分子之间的相互作用、结合模式和亲和力, 还可以通过研究蛋白受体和小分子配体之间的识别和相互作用来发现并设计药物^[10]。将 4 个核心蛋白与主要有效成分进行分子对接, 即利用 AutoDockTools 1. 5. 7 软件准备蛋白受体和小分子配体文件, 并用 PyMOL 2. 4. 0 软件将二者的对接结果可视化, 结果显示相比 4-亚甲酰亚胺, 木犀草素、异黄酮与 4 个核心靶点 (ESR1、NCOA1、NR3C1、NCOA2) 的结合能更低, 结构更稳定, 表明木犀草素、异黄酮可能是强心汤治疗 CHF 的核心活性化合物。

本研究基于网络药理学和分子对接技术, 对强心汤治疗慢性心力衰竭的主要化学成分和潜在机制进行了初步探索。结果表明, 强心汤可能通过神经活性配体-受体的相互作用、钙信号通路、多巴胺能突触、化学致癌-受体激活、cGMP-PKG 信号通路、脂质和动脉粥样硬化、cAMP 信号通路等发挥治疗作用; ESR1、NCOA1、NR3C1、NCOA2 可能是强心汤治疗慢性心力衰竭的核心治疗靶点; 木犀草素、异黄酮可能是强心汤的主要活性成分。本研

究结果为进一步研究强心汤治疗慢性心力衰竭的机制提供了参考和依据。但受实验条件限制, 本研究未能对信号通路进行完整的通路验证, 以致对强心汤的具体作用机制的探索尚且欠缺, 后期将进一步深入阐述。

参考文献

- [1] METRA M, TOMASONI D, ADAMO M, et al. Worsening of chronic heart failure: definition, epidemiology, management and prevention. A clinical consensus statement by the Heart Failure Association of the European Society of Cardiology[J]. Eur J Heart Fail, 2023, 25(6): 776-791.
- [2] FILIPPO C. Epidemiology and treatment of acute and chronic heart failure [J]. Eur Heart J, 2023, 44 (5): 329-332.
- [3] 温志浩, 卢健棋, 潘朝铨, 等. 强心汤对慢性心衰患者生存质量影响的研究[J]. 世界中西医结合杂志, 2015, 10 (2): 204-206.
- [4] 温志浩, 卢健棋, 潘朝铨, 等. 强心汤对慢性心衰患者运动耐量影响的研究[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2014, 12(11): 1291-1293.
- [5] BARABÁSI AL, GULBAHCE N, LOSCALZO J. Network medicine: a network-based approach to human disease [J]. Nat Rev Genet, 2011, 12(1): 56-68.
- [6] NAQVI AAT, MOHAMMAD T, HASAN GM, et al. Advancements in docking and molecular dynamics simulations towards ligand-receptor interactions and structure-function relationships [J]. Curr Top Med Chem, 2018, 18 (20): 1755-1768.
- [7] SAIKIA S, BORDOLOI M. Molecular docking: challenges, advances and its use in drug discovery perspective. [J]. Curr Drug Targets, 2019, 20(5): 501-521.
- [8] 秘红英, 郎艳松, 李晓琳, 等. 慢性心力衰竭病机及治疗研究进展[J]. 中医杂志, 2014, 55(16): 1430-1432.
- [9] 庞延, 林浩, 卢健棋, 等. 强心汤联合八段锦治疗老年慢性心力衰竭伴衰弱患者的临床疗效[J]. 中国实验方剂学杂志, 2023, 29(4): 104-109.
- [10] CHEN G, SEUKEP AJ, GUO M. Recent advances in molecular docking for the research and discovery of potential marine drugs. [J]. Mar Drugs, 2020, 18 (11): 545-545.

Potential Mechanism of Action of *Qiangxin Decoction* (强心汤) for Chronic Heart Failure Based on Network Pharmacology and Molecular Docking

MAO Meiling¹, LU Jianqi², XIE Liyu¹, PANG Yan², ZHANG Ding¹, SHI Weiqi¹, LIU Shuihua¹, CAI Zongyu¹, ZHANG Shiyu¹, HUANG Min¹

1. Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning, 530200; 2. The First Affiliated Hospital of Guangxi University of Traditional Chinese Medicine

ABSTRACT **Objective** To reveal the targets and molecular mechanisms of the action of *Qiangxin Decoction* (强心汤) for the treatment of chronic heart failure based on the combination of network pharmacology and molecular docking. **Methods** The active ingredients of *Qiangxin Decoction* were retrieved from TCMSP database, and the targets of chronic heart failure were screened by searching GeneCards, OMIM, TTD, PharmGkb, and DrugBank databases, and the intersections were taken to obtain the intersecting targets of *Qiangxin Decoction* for the treatment of chronic heart failure. STRING platform was used to construct the protein-protein interaction network (PPI), Cytoscape 3.8.0 software was used to calculate the network topology to screen the core targets, and R 4.2.3 was used to construct the “active ingredient-target” network by analyzing the GO enrichment analysis and KEGG pathway enrichment analysis. AutoDock 1.5.7 was used for molecular docking to predict the binding performance of active ingredients and core targets. **Results** Seventy-five intersecting targets were identified for the treatment of chronic heart failure with *Qiangxin Decoction*, among which the core targets were estrogen receptor 1 (ESR1, degree value=7), nuclear receptor coactivator 1 (NCOA1, degree value=8), glucocorticoid receptor (NR3C1, degree value=7), and nuclear receptor coactivator 2 (NCOA2, degree value=7). GO enrichment analysis showed that the top 3 items with the smallest *P* value in molecular function were G protein-coupled amine receptor activity, postsynaptic neurotransmitter receptor activity, and neurotransmitter receptor activity ($P<0.01$); the top 3 items with the smallest *P* value in biological process were adenylyl cyclase-activated adrenergic receptor signaling pathway, adrenergic receptor signaling pathway, and adenylyl cyclase-regulated G protein-coupled receptor signaling pathway ($P<0.01$); the top 3 items with the smallest *P* values in cellular composition were components of the postsynaptic membrane, synaptic membrane, and presynaptic membrane ($P<0.01$). KEGG enrichment analysis showed that the top 5 key signaling pathways were neuroactive ligand-receptor interactions, calcium signaling pathway, dopaminergic synapses, cocaine addiction, and cyclic guanosine monophosphate-protein kinase G (cGMP-PKG) signaling pathway. The molecular docking results showed that lignans and isoflavones had lower binding energies and more structural stability with the four core targets (ESR1, NCOA1, NR3C1, NCOA2). **Conclusion** The treatment of chronic heart failure by *Qiangxin Decoction* was associated with neuroactive ligand-receptor interactions, calcium signaling pathway, dopaminergic synapses, chemoattractant-receptor activation, cGMP-PKG signaling pathway, lipids and atherosclerosis, and cAMP signaling pathway, and lignans and isoflavones may be the core active compounds in its treatment of chronic heart failure.

Keywords chronic heart failure; *Qiangxin Decoction*; network pharmacology; molecular docking; core targets

(收稿日期: 2023-04-20; 修回日期: 2023-08-26)

[编辑: 王利芬]