

· 方药研究 ·

基于 GEO 数据芯片与网络药理学探讨丹葛止痛方治疗冠心病的作用机制

王莹¹ 陈岩²

摘要 目的:采用 GEO 芯片数据挖掘与网络药理学的方法,找出冠心病的差异表达基因,探讨丹葛止痛方治疗冠心病的作用机制。方法:基于 GEO 数据库及 GEO2R 平台筛选出冠心病的差异表达基因,利用药物靶点数据库分析平台,获取丹葛止痛方的活性成分及其对应的靶点,对比丹葛止痛方与冠心病的差异表达基因,获取共同靶点,基于共同靶点进行蛋白质相互作用(PPI)分析、GO 功能与 KEGG 通路富集分析。结果:获取冠心病差异表达基因 2517 个,丹葛止痛方靶点 222 个,两者匹配后获得共同靶点 30 个,PPI 网络中获取核心靶点前 5 的依次为 VEGFA、ESR1、MMP9、MDM2、PTGS2;GO 富集分析共筛选出 45 个条目,KEGG 通路富集分析共筛选出 43 条信号通路。结论:丹葛止痛方可通过多途径、多靶点治疗冠心病,为指导临床治疗及新药研发提供了科学依据。

关键词 GEO 数据挖掘;网络药理学;丹葛止痛方;冠心病;作用机制

冠状动脉粥样硬化性心脏病(简称“冠心病”),是指由于冠状动脉粥样硬化使管腔狭窄、痉挛或阻塞导致心肌缺血、缺氧或坏死而引发的心脏病,是临床最常见的心血管疾病之一^[1]。目前,冠心病的治疗以西药为主,但是西药的不良反应较大,而中药在亚洲地区治疗冠心病方面取得了较好的临床效果^[2]。本文研究的丹葛止痛方(药物组成:丹参 12 g,葛根 12 g,枳壳 10 g,青皮 6 g,鸡血藤 20 g,当归 10 g,百合 10 g,三七 10 g,甘草 6 g)为广西名中医蒙定水教授治疗冠心病的临床经验方^[3]。笔者拟用网络药理学方法,整合 GEO 芯片数据,挖掘冠心病的潜在靶点,分析丹葛止痛方治疗冠心病的作用机制,以期为临床治疗提供理论支持。

1 材料与方法

1.1 冠心病靶点筛选 利用 GEO 数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo>),以“Coronary heart disease”为检索词,获取到两个冠心病数据集 GSE71226、GSE98583 芯片,通过 GEO2R 与 BioJupies 在线分析工具分析两组芯片的差异表达基因,剔除差异倍数 <1 、 $P > 0.05$ 的数据,并绘制火山图与热图。

1.2 丹葛止痛方活性成分及靶点获取 借助中药系统药理学分析 TCMSp(<https://old.tcmsp-e.com/tcmsp.php>),以“鸡血藤、葛根、丹参、枳壳、百合、青皮、三七、当归、甘草”为关键词检索其活性成分和靶点,筛选出口服生物利用度(OB) $\geq 30\%$ 和类药性(DL) ≥ 0.18 的化学成分作为活性成分及相关靶标蛋白。用 Uniprot(<https://www.uniprot.org/>)进行基因名转换。利用 Cyto-scape 3.70 软件中的 cytoHubba 插件根据度(Degree)值运算得到前 5 名活性成分。

1.3 共同靶点的筛选与 PPI 网络构建 将 1.1 中 GSE71226、GSE98583 芯片的差异表达基因与 1.2 中丹葛止痛方的靶点,利用 Venny 2.10 在线工具对比分析,获取共同靶点,将其输入 STRING 11.5 平台(<http://cn.string-db.org/>)获取构建蛋白质相互作用 PPI 网络数据,再运用 Cytoscape 3.70 软件构建丹葛止痛方 PPI 可视化网络图,并用 Cytoscape hubba 插件获取 Degree 值前 5 的靶蛋白。

1.4 GO 富集分析和 KEGG 通路富集分析 为分析丹葛止痛方发挥药理作用的主要信号通路及生物过程,将共同靶点以 Gene Symbol 的格式导入 DAVID 6.8 生物信息平台(<https://david.ncifcrf.gov/>),设置物种为“HomoSapiens”,对共同靶点进行 GO 功能和 KEGG 通路富集分析。GO 富集分析包括生物过程(BP)、细胞

• 作者单位 1. 辽宁中医药大学(辽宁 沈阳 110847); 2. 辽宁中医药大学附属医院(辽宁 沈阳 110032)

组分(CC)、分子功能(MF)。以 $P \leq 0.05$ 为筛选条件, 选出GO功能条目与KEGG信号通路, 绘制柱状图与气泡图及成分-靶点-通路图。

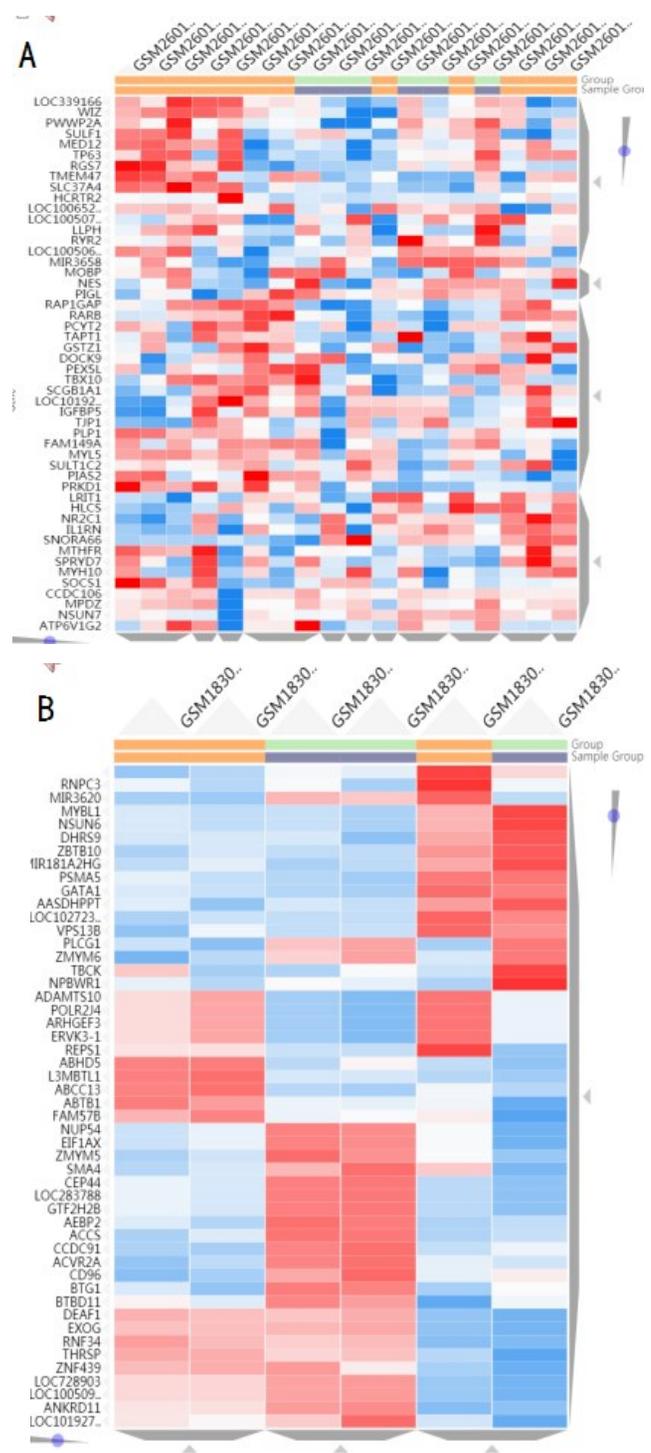
2 结果

2.1 冠心病差异基因结果 以GSE98583芯片中12例冠状动脉病变患者为实验组, 6例正常人为对照组, 获取差异表达基因520个, 绘制前50位差异表达基因热图(见图1A); 以GSE71226芯片中3例冠心病患者为实验组, 3例正常人为对照组, 获取差异表达基因2048个, 绘制前50位差异表达基因热图(见图1B)。整合两个芯片数据, 获取下调基因732个, 上调基因1785个, 绘制火山图(见图2)。

2.2 丹葛止痛方潜在药物靶点筛选结果 通过TCMSP检索到丹葛止痛方含有919种活性成分, 经筛选得到相关靶点的活性化合物207个, 其中16种化合物同时存在于几种中药中, Degree值前5的成分依次为毛地黄黄酮、芒柄花素、柚皮素、 β -谷甾醇、甘草查尔酮a, 见表1。剔重后将191个化合物通过Uniprot数据库进行基因名转化后得到222个靶点。

2.3 共同靶点筛选结果与PPI网络的构建 将2.1中得到的冠心病差异表达基因与2.2得到的靶点利用Venny 2.10在线工具对比分析, 获取共同靶点30个(上调基因23个, 下调基因7个)。将其导入String数据库, 获取PPI相关数据并通过Cytoscape软件绘制PPI网络图。PPI网络中有30个节点, 119条边, 平均Degree值为10, 通过Cytoscape_Hubba插件计算Degree值, 其中排名前5的靶点依次为VEGFA、ESR1、MMP9、MDM2、PTGS2。见图3。

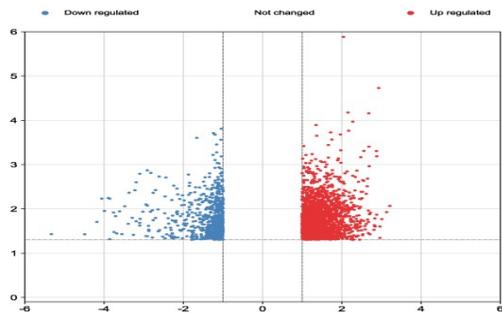
2.4 GO富集分析 共筛选出45个条目, 其中生物过程23个、分子功能8个、细胞组分14个。生物过程主要富集在负调节cysteine-type肽链内切酶活动参与凋亡过程(negative regulation of cysteine-type endopetidase activity in apoptotic)、正向调节细胞凋亡(positive regulation of apoptotic process)、参与cytokine-mediated信号通路(cytokine-mediated signaling pathway)、蛋白质磷酸化(Protein phosphorylation)、应对缺氧(response to hypoxia)等过程。分子功能主要富集在锌离子结合(enzyme binding)、序列特异性双链DNA结合(transcription factor activity, sequence-specific DNA binding)、调节丝氨酸/苏氨酸蛋白质酪氨酸激酶活性等细胞功能(protine/serine/threonine/



X轴橙色为实验组, 绿色为对照组, 红色为基因高表达, 蓝色为基因低表达; A为GSE98583芯片中的差异表达基因; B为GSE71226芯片中的差异表达基因

图1 冠心病差异表达基因热图

tyrosine kinase activity)等。细胞组分主要富集在核浆(nucleoplasm)、等离子体膜(plasmamembrane)、细胞膜表面(cell surface)等部分。见图4。

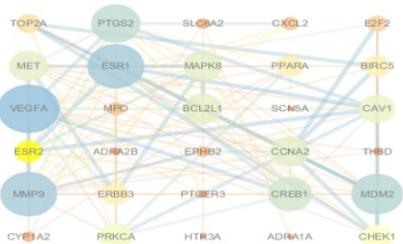


蓝色为下调基因,红色为上调基因

图2 冠心病差异表达基因火山图

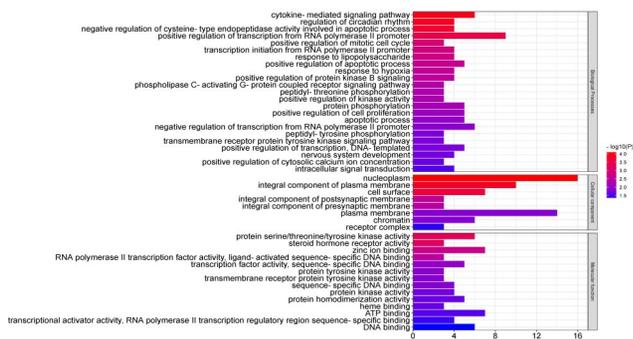
表1 丹葛止痛方含有的Degree值前5位的活性成分

分子编码	成分名称	来源药物	Degree 值
MOL000006	Luteolin (毛地黄黄酮)	鸡血藤、枳壳、丹参	47
MOL004328	Naringenin (柚皮素)	枳壳、青皮、甘草	30
MOL000358	beta-sitosterol (β-谷甾醇)	鸡血藤、葛根、当归、三七	26
MOL000392	Formononetin (芒柄花素)	鸡血藤、当归、甘草	26
MOL000497	licochalcone a (甘草查尔酮 a)	鸡血藤、甘草	24



Degree 值越大,节点越大颜色越深;节点之间关联程度越高,线条越粗

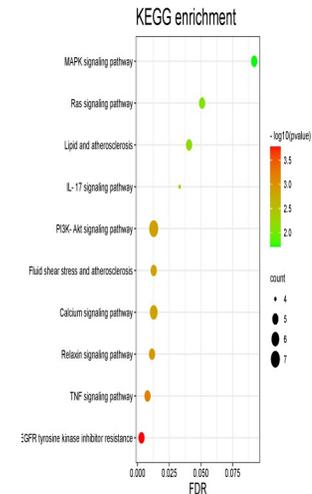
图3 丹葛止痛方与冠心病共同靶点PPI网络图



X轴为条目富集个数,Y轴为BP、CC、MF富集条目

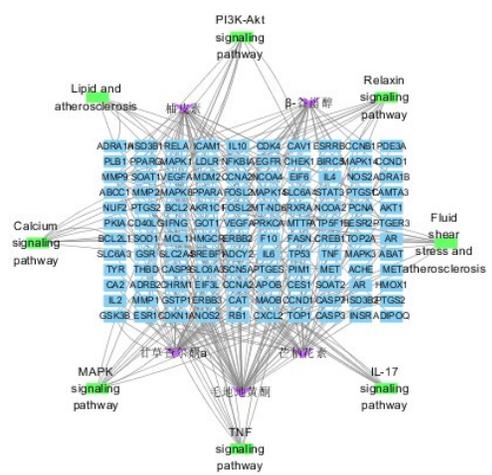
图4 丹葛止痛方与冠心病共同靶点GO富集分析柱状图

2.5 KEGG 通路富集分析 共筛选出43条信号通路,选取与冠心病相关的信号通路绘制气泡图(见图5)。KEGG 信号通路主要富集于PI3K-Akt 信号通路(PI3K-Akt signaling pathway)、脂质和动脉粥样硬化(lipid and atherosclerosis)、钙信号通道(Calcium signaling pathway)、流体剪切应力和动脉粥样硬化(Fluid shear stress and atherosclerosis pathway)、TNF 信号通路(TNF signaling pathway)、IL-17 信号通路(IL-17 signaling pathway)、松弛素信号通路(Relaxin signaling pathway)等。由于丹葛止痛方的活性成分较多,因此笔者选取β-谷甾醇、柚皮素、毛地黄黄酮、芒柄花素、甘草查尔酮a 这五种主要成分与冠心病相关的KEGG 信号通路构建成分-靶点-通路图(图6)。



富集个数越多,气泡越大

图5 丹葛止痛方与冠心病共同靶点KEGG 信号通路气泡图



紫色为PPI中排名前五的核心靶点

图6 丹葛止痛方活血成分与冠心病共同靶点-通路网络图

3 讨论

冠心病归属于中医学“胸痹”的范畴。张仲景在《金匮要略》中定义胸痹的病机为“阳微阴弦”，认为其病机特点为上焦阳气亏虚，痰饮、瘀血等阴寒之邪上犯，导致了胸痹的发生^[4]。丹葛止痛方中丹参、葛根可升阳通脉活血；枳壳、青皮可理气化瘀，共助丹参、葛根活血通阳止痛；鸡血藤、当归能活血补血；三七活血通脉；百合能敛气养心；甘草能缓急止痛，诸药合用，共奏通阳活血止痛之功^[5]。本研究基于 GEO 芯片数据及相关数据平台，探讨丹葛止痛方治疗冠心病的药理机制，为临床治疗提供理论依据。

本研究发现丹葛止痛方富含多种活性成分，其中毛地黄黄酮、 β -谷甾醇、芒柄花素、柚皮素、甘草查耳酮 a 存在于多种中药。毛地黄黄酮(Lut)是一种黄酮类化合物，具有抗氧化、抗肿瘤和抗炎的特性。据报道^[6]，Lut 在体外和体内具有保护心脏的作用。 β -谷甾醇(BS)是一种植物甾醇，可以降低胆固醇、抗炎、抗氧化、抗动脉粥样硬化及预防糖尿病的发生。芒柄花素具有舒张血管的作用，可作用于内皮以增强 NO 和内皮衍生的超极化因子的释放，在血管平滑肌中，可调节钙和钾通道，导致超极化和松弛^[7]。柚皮素是黄酮类化合物，有降脂作用以及抗炎和抗动脉粥样硬化的特性^[8]。甘草查耳酮 A 是源自甘草的黄酮类化合物，具有抗炎、抗哮喘、抗氧化、抗菌和抗肿瘤特性，还可以抑制钾和钙通道以阻止动脉粥样硬化的进展^[9-10]。

通过 PPI 网络分析，获取治疗冠心病的核心靶点，排名前五的依次为 VEGFA、ESR1、MMP9、MDM2、PTGS2。VEGFA 可影响血管通透性，诱导巨噬细胞和小胶质细胞产生促炎和促血管生成介质^[11]。ESR1 在脂质代谢方面具有重要调节作用^[12]。MMP9 可通过调节细胞因子、趋化因子、生长因子、激素和血管生成因子的表达和活性来监督心肌细胞衰老过程中的细胞信号传导^[13]。MDM2 是 P53 的调节剂，P53 是一种作为肿瘤抑制因子和凋亡调节因子的抗癌基因蛋白，可诱发级联反应，诱导心肌细胞凋亡^[14]。PTGS2 可以抑制血小板聚集，保护心血管^[15]。

GO 富集分析表明丹葛止痛方治疗冠心病的靶点在负调节 cysteine-type 肽链内切酶活动参与凋亡过程、正向调节细胞凋亡、cytokine-mediated 信号通路、蛋白质磷酸化、应对缺氧等过程；分子功能主要富集在锌离子结合、序列特异性双链 DNA 结合、调节丝氨酸/苏氨酸蛋白质酪氨酸激酶活性等细胞功能等；细

胞组分主要富集在核浆、等离子体膜、突触后神经元等部分。

KEGG 通路富集分析发现，核心靶点主要富集于 PI3K-Akt 信号通路、脂质和动脉粥样硬化、钙信号通道、流体剪切应力和动脉粥样硬化、TNF 信号通路、IL-17 信号通路、松弛素信号通路等。PI3K-Akt 信号通路可以调节缺氧诱导因子-1 α (HIF-1 α)的表达，参与血管生成的下游蛋白(如 VEGFA)表达以改善缺血^[16]。钙信号传导在血管平滑肌细胞(VSMC)细胞功能中起核心作用，钙信号通路可调控血管平滑肌张力^[17]。流体剪切应力通路可触发 PECAM-1 与波形蛋白细胞骨架结合的上游途径，增加 PECAM-1 上的张力，从而将力从肌球蛋白传递到 PECAM-1。PECAM-1 上的张力触发 Src 家族激酶的激活，导致 VEGFA 的配体非依赖性反式激活和随后的 PI3K、内皮 NOS(eNOS)的激活和 NO 的产生，以诱导血管舒张，具有高剪切应力的持续层流上调内皮细胞基因和蛋白质(如 MMP9)的表达，具有抗动脉粥样硬化的作用^[18]。松弛素通路中松弛素与同源受体 RXFP1 结合并激活多种信号通路(如 MAPK)以及通过改变 TGF- β 、MMP、VEGF 和内皮素受体的基因表达，有效阻止或逆转包括缺血/再灌注损伤、心肌梗塞、高血压性心脏病和心肌病等心血管疾病的不良事件^[19]。此外，研究^[20]表明，脂质、钙及炎症在冠心病的发病机制中具有重要意义。TNF、IL-17 信号通路可调控炎症反应，对防治冠心病亦有积极意义^[201-22]。

综上所述，丹葛止痛方主要是通过 β -谷甾醇、柚皮素、毛地黄黄酮、芒柄花素等成分，作用于 VEGFA、ESR1、MMP9、MDM2、PTGS2 等靶点，对 PI3K-Akt、钙通道、流体剪切应力和动脉粥样硬化、松弛素通路等信号通路进行调控，从而治疗冠心病。

参考文献

- [1]《中成药治疗优势病种临床应用指南》标准化项目组. 中成药治疗冠心病临床应用指南(2020 年)[J]. 中国中西医结合杂志, 2021, 41(4): 391-417.
- [2] WANG C, NIIMI M, WATANABE T, et al. Treatment of atherosclerosis by traditional Chinese medicine: questions and quandaries[J]. Atherosclerosis, 2018, 277:136-144.
- [3] 周永喜, 舒建龙. 丹葛止痛方联合硝酸异山梨酯治疗冠状动脉粥样硬化性心脏病心绞痛随机平行对照研究[J]. 实用中医内科杂志, 2016, 30(10):65-67.
- [4] 李维娜, 冯玲, 王秋风, 等. 国医大师路志正从肝脾论治胸痹掣

(下转第 60 页)