

基于网络药理学和体外实验探讨参芪扶正液对高糖诱导心肌损伤的保护作用

李 琴¹, 贺旭威², 张勇刚², 魏文滨², 陈继铭^{2*} (1. 广东医科大学药学院, 广东东莞 523808; 2. 广东医科大学附属医院, 广东湛江 524001)

摘要: **目的** 探讨参芪扶正液对高糖诱导心肌损伤的潜在作用机制。**方法** 从TCMSP、GeneCards和OMIM数据库中分别筛选参芪扶正液活性成分、作用靶点及心肌损伤基因, 通过String数据库构建蛋白质相互作用(PPI)网络, 使用Metascape数据库对交集基因进行GO、KEGG分析。H9c2心肌细胞分别用35 mmol/L葡萄糖或1、5 g/L参芪扶正液处理, MTT法检测细胞存活率, 荧光染色检测细胞凋亡, Western blot检测PI3K/AKT表达。**结果** 发现参芪扶正液495个作用靶点, 心肌损伤靶点基因2 148个, 两者交集基因为227个, 主要涉及内分泌抵抗、HIF-1、AMPK、PI3K/AKT等信号通路。参芪扶正液可增加心肌细胞存活, 减少细胞凋亡, 上调p-PI3K和p-AKT表达($P < 0.05$)。**结论** 参芪扶正液可能通过PI3K/AKT信号减轻高糖诱导的心肌损伤。

关键词: 参芪扶正液; 心肌损伤; 网络药理学; PI3K/AKT信号通路

中图分类号: R 285

文献标志码: A

文章编号: 2096-3610 (2024) 04-0384-06

Protective effect of Shenqi Fuzheng liquid on high glucose-induced myocardial injury using network pharmacology and in vitro experiment

LI Qin¹, HE Xu-wei², ZHANG Yong-gang², WEI Wen-bin², CHEN Ji-ming^{2*} (1. School of Pharmacy, Guangdong Medical University, Dongguan 523808, China; 2. Affiliated Hospital of Guangdong Medical University, Zhanjiang 524001, China)

Abstract: **Objective** To explore the potential mechanism of Shenqi Fuzheng liquid (SFL) on high glucose-induced myocardial injury (MI). **Methods** The active ingredients and targets of SFL, and MI genes were screened from TCMSP, GeneCards and OMIM databases, respectively. A PPI network was constructed using String database, and the intersection genes were analyzed by GO and KEGG using Metascape database. H9c2 myocardial cells were treated with 35 mmol/L glucose or adding with 1 and 5 g/L SFL. Survival rate, apoptosis and PI3K/AKT expression were detected by MTT, fluorescence staining and Western blot, respectively. **Results** There were 495 active ingredients of SFL, 2 148 genes of MI, and 227 intersecting genes between them. These intersecting genes were mainly involved in endocrine resistance, HIF-1, AMPK, PI3K/AKT signaling pathways. SFL increased survival rate, reduced apoptosis, and upregulated p-PI3K/p-AKT expression of injured myocardial cells. **Conclusion** SFL can alleviate high glucose-induced MI through PI3K/AKT signaling.

Key words: Shenqi Fuzheng liquid; myocardial injury; network pharmacology; PI3K/AKT signaling

心肌损伤是导致心血管疾病发生发展的主要原因之一。严重心肌损伤后, 心肌细胞的收缩能力减弱, 心脏泵血功能下降, 使得全身各个器官和组织得不到充足的血液供应, 进而影响到正常的生理功能, 长期心脏功能下降还可导致心肌肥厚、心衰等病变, 严重威胁人

类健康。高糖是导致心肌损伤的常见原因之一, 血糖的持续升高, 导致心肌结构、功能和表型发生的变化, 主要表现为心肌细胞坏死凋亡、心肌细胞肥大、细胞外间质增多、心肌纤维化等, 最终导致室壁肥厚, 心腔增大, 心室结构改变, 心室顺应性降低, 心功能恶化^[1-2]。

收稿日期: 2024-04-30

基金项目: 广东省中医药局中医药科研项目(20222101, 20212098, 20222105), 广东省医学科学技术研究基金项目(A2020459), 湛江市科技发展专项资金竞争性分配项目(2021A05063)

作者简介: 李 琴, 女, 高级实验师, 博士, E-mail: qingzi9697@gdmu.edu.cn

通信作者: 陈继铭, 男, 主任医师, 硕士, E-mail: 4856071@qq.com

因此,在心血管疾病治疗中,对心肌损伤的有效预防和治疗显得尤为关键。

以党参和黄芪作为主要成分的参芪扶正液,具有益气扶正固本的功效,能有效缓解因正气不足导致的心悸、气短、乏力等心气不足的症状,正好体现了中医“虚则补之”的治疗原则^[3]。临床研究发现该药具有改善心肌供血和保护心脏的作用,能预防和缓解对心脏的毒性^[4-5]。参芪扶正液在临床上的疗效已经得到了广泛的认可和应用,特别是在心血管疾病的治疗中,参芪扶正液展现出良好的治疗效果。然而,关于其在心血管疾病中的具体作用机制,目前的研究尚不够深入和全面。

本研究采用网络药理学的方法,通过构建活性成分—靶点—疾病网络,在分子水平上系统分析参芪扶正液主要活性成分,抗心肌损伤的关键作用靶点并探讨其可能的作用机制,进一步在细胞水平进行验证,以期揭示参芪扶正液在心肌损伤中作用及分子机制,为临床上心肌损伤的防治提供理论基础。

1 材料和方法

1.1 材料

参芪提取液(丽珠集团利民制药厂),胚胎牛血清(GIBC公司,美国),DMEM培养基(Hyclone公司,美国),H9c2细胞株为大鼠胚胎心肌细胞(上海盖宁生物科技有限公司)。

1.2 网络药理学研究

1.2.1 参芪扶正液活性成分的筛选 利用中药系统药理学的分析工具TCMSP(<http://lsp.nwu.edu.cn/tcmsp.php>),对黄芪和党参的所有化学物质进行了检索。基于口服生物利用度 $OB \geq 30\%$ 和类药性 $DL \geq 0.18$ 的筛选标准,筛选出黄芪和党参的相关活性成分,借助Swiss Target Prediction数据库(<https://www.uniprot.org/>)来搜寻与有效活性成分对应靶点基因。

1.2.2 心肌细胞损伤相关靶点及交集靶点的筛选 基于GeneCards(<https://www.genecards.org/>)、OMIM(<https://omim.org/>)数据库,搜索关键词为“cardiomyocyteinjury”疾病靶点,对结果汇总后删除重复基因,即得到心肌细胞损伤靶点基因。利用Venny2.1在线工具对参芪扶正液活性成分与心肌细胞损伤的靶点基因取交集并绘制韦恩图,获得二者的交集靶点即为参芪扶正液活性成分干预心肌细胞损伤的潜在关键作用靶点。

1.2.3 参芪扶正液活性成分—作用靶点网络的构建

将所得的交集靶点上传到STRING database(<https://www.string-db.org/>)以构建蛋白质—蛋白质相互作用网络。将蛋白质种类设置为“homo sapiens”,置信水平设置为“中等置信度(0.400)”,构建参芪扶正液与心肌损伤共同靶点蛋白的PPI网络。然后将PPI网络的数据导入至Cytoscape 3.10.1软件,进行网络构建和拓扑分析,并从中筛选出关键的网络靶点。核心目标的筛选参数包括:点度中心性(degree centrality, DC)、中介中心性(betweenness centrality, BC)以及接近中心性(closeness centrality, CC)。计算交集基因的DC、BC、CC数值,并筛选出关键的靶点。

1.2.4 富集分析 利用metascape数据库(<https://metascape.org/>),对基因本体论(GO)的功能进行了富集,并通过基因组百科全书(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG)途径进行了富集分析。其中GO分析涵盖了生物过程(BP)、细胞组成(CC)以及分子功能(MF)。按校正 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义的标准进行筛选,并依据 P 值由小到大排序,分别选取GO分析前10位、KEGG分析前20位的结果进行绘图。利用微生信技术平台,对富集分析得出的数据进行了可视化的图形处理。

1.3 H9c2心肌细胞体外实验

1.3.1 高糖诱导心肌细胞损伤模型的建立及分组 选取生长较好的H9c2细胞,重悬后将其接种于96孔板内,细胞密度为 5×10^3 个/mL,每孔加入含有细胞的100 μ L重悬液,放置于37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 培养箱中培养,待细胞贴壁汇合成80%~90%状态时,用胰酶37 $^{\circ}$ C消化1 min,离心重悬后分为:con组(正常对照)、M组(葡萄糖浓度为35 mmol/L)、SQ-低组(葡萄糖浓度为35 mmol/L+参芪扶正液1 g/L)和SQ-高组(葡萄糖浓度为35 mmol/L+参芪扶正液5 g/L)。

1.3.2 MTT法检测H9c2心肌细胞存活率 取对数生长长期的H9c2心肌细胞,进行相应处理后弃去培养基,每孔加入100 μ L(5 mg/ml)的MTT溶液,继续培养4 h,待结晶充分形成后,用移液枪吸干培养基,加入100 μ L DMSO溶解液,待结晶全部溶解后,酶标仪570 nm测吸光度,最后以自身对照计算作图。

1.3.3 Hoechst33342染色检测细胞凋亡 按“1.3.1”条件处理并收集细胞,PBS洗涤3次,每孔加入1 mL的10 μ mol/L DCFH-DA荧光探针的无血清培养基,将其置于培养箱内继续培养30 min,弃掉染液,PBS洗涤3次,用倒置荧光显微镜观察荧光强度、拍照并分析,实验重复3次。

1.3.4 Western blot 法检测相关蛋白表达 根据RIPA裂解缓冲液(上海碧云天生物技术有限公司, 上海中国)的指导, 从各组H9c2心肌细胞中提取蛋白, 并使用BCA蛋白检测试剂盒(赛默飞世尔科技有限公司, 上海中国)进行定量分析。依据蛋白质的分子量来制备分离胶与浓缩胶, 进行SDS-PAGE电泳至溴酚蓝到达分离胶底部, 再转PVDF膜, 在含5%脱脂奶粉的TBST中, 室温封闭1h, 将膜置于一抗(AKT抗体、p-AKT抗体、p-P13K抗体、P13K抗体、GAPDH抗体)中4℃孵育过夜, TBST洗3次, 每次10min, 用封闭液将Anti-Rabbit稀释至1:5000, 室温下孵育PVDF膜1.5h, TBST清洗3次, 10min/次, 然后分别使用增强化学发光系统和Image Pro-Plus对蛋白质条带进行成像和量化处理。

1.4 统计学处理

选用SPSS10.0统计软件进行数据分析, 组间差异性应用单因素方差分析, 使用均值和标准差($\bar{x} \pm s$)表示, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 参芪扶正液活性化学成分和靶点筛选

在TCMSP数据库以 $OB \geq 30\%$ 、 $DL \geq 0.18$ 为条件筛选后得到黄芪的活性成分20种、党参的活性成分为21种, 经Swiss Target Prediction数据库查找后, 我们总共找到了1976个药物作用靶点, 在剔除了重复的靶点后, 确定了495个药物作用靶点。

2.2 心肌细胞损伤相关靶点及交集靶点的筛选

从GeneCards数据库($score \geq 1$)、OMIM数据库中收集心肌损伤靶点基因, 共得到2148个基因。利用venn图与参芪扶正液活性成分靶点基因取交集, 筛选得到227个共同靶点基因(图1)。

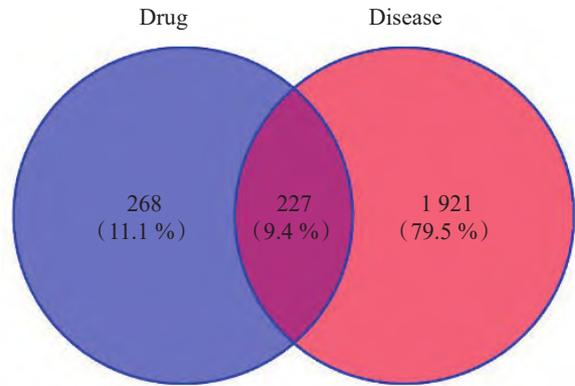


图1 参芪扶正液和心肌细胞损伤靶点韦恩图

2.3 参芪扶正液活性成分-作用靶点网络的构建

运用Cytoscape 3.10.1软件构建出参芪扶正液“活性成分-靶标”网络图。该网络中共有252个节点, 249条边。其中左侧圆形代表活性成分, 红色字体代表黄芪, 蓝色字体代表党参, 右侧黑色字体表示潜在作用靶点(图2)。

2.4 构建参芪扶正液活性成分干预心肌损伤的潜在作用靶标PPI网络

使用STRING数据库构建蛋白互作网络, 得到227个节点和3491条边, 将PPI信息导入至Cytoscape

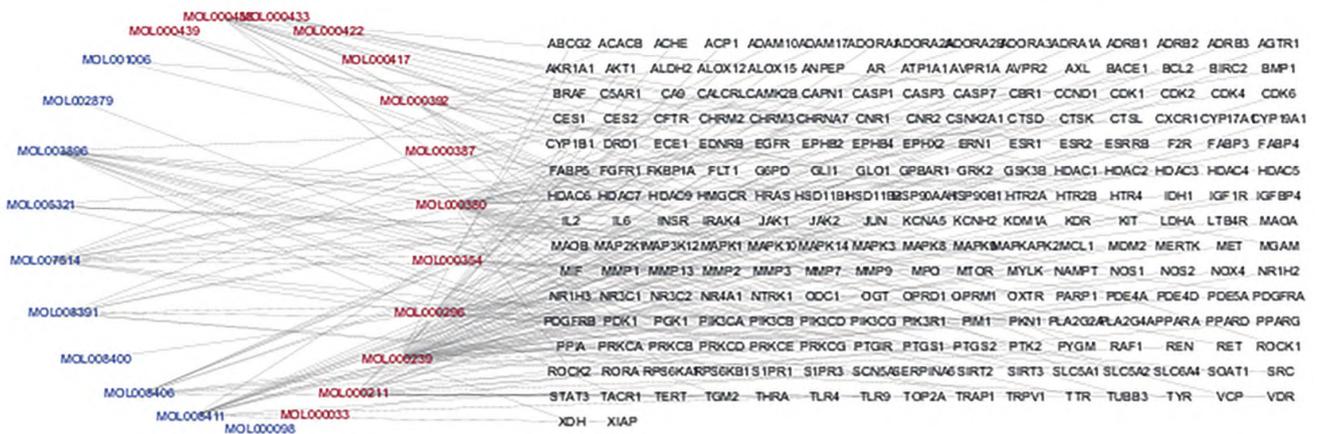


图2 参芪扶正液活性成分和心肌细胞损伤交集靶点网络图

软件, 使用centiscape 2.2插件, 计算交集基因的DC、BC、CC数值, 共筛选核心靶点36个(图3)。

2.5 GO富集分析与KEGG富集分析

参芪扶正液和心肌损伤的共同靶点导入Metascape数据平台, 进行GO功能分析, 见图4: 参芪扶正

液治疗心肌损伤主要涉及激素反应和磷酸化的信号通路等生物过程(biological process, BP), 涉及的细胞组成(cellular component, CC)包括受体复合体、细胞质核周区, 影响的分子功能(molecular function, MF)多集中在蛋白激酶活性、蛋白酪氨酸激酶活性等。

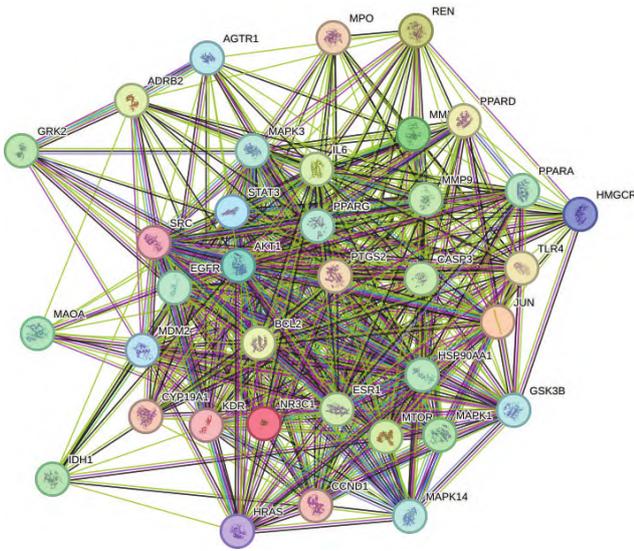


图3 蛋白互作核心网络图的构建

KEGG 富集分析显示前 20 条通路 ($P < 0.05$, 图 5) 主要涉及内分泌抵抗、HIF-1 信号通路、PI3K-AKT 信号通路、AMPK 信号通路等, 上述途径可能与参芪扶正液干预心肌损伤的发生发展有关。

2.6 参芪扶正液对 H9c2 心肌损伤的体外实验研究

2.6.1 参芪扶正液对心肌损伤细胞存活率的影响 采用 MTT 法测定各组心肌细胞存活率, 结果发现在高糖损伤下, M 组心肌细胞的存活率与 con 组相比明显降低 ($P < 0.05$); 与 M 组相比, SQ-低组和 SQ-高组心肌细胞存活率均有不同程度增加 ($P < 0.05$), 提示参芪扶正液对高糖诱导的心肌细胞损伤具有很好的保护作用 (图 6)。

2.6.2 参芪扶正液对损伤心肌细胞凋亡的影响 Hochest33342 染色结果显示: 与 con 组比较, M 组细胞核蓝色荧光增强, 细胞凋亡率升高 ($P < 0.05$); 与 M

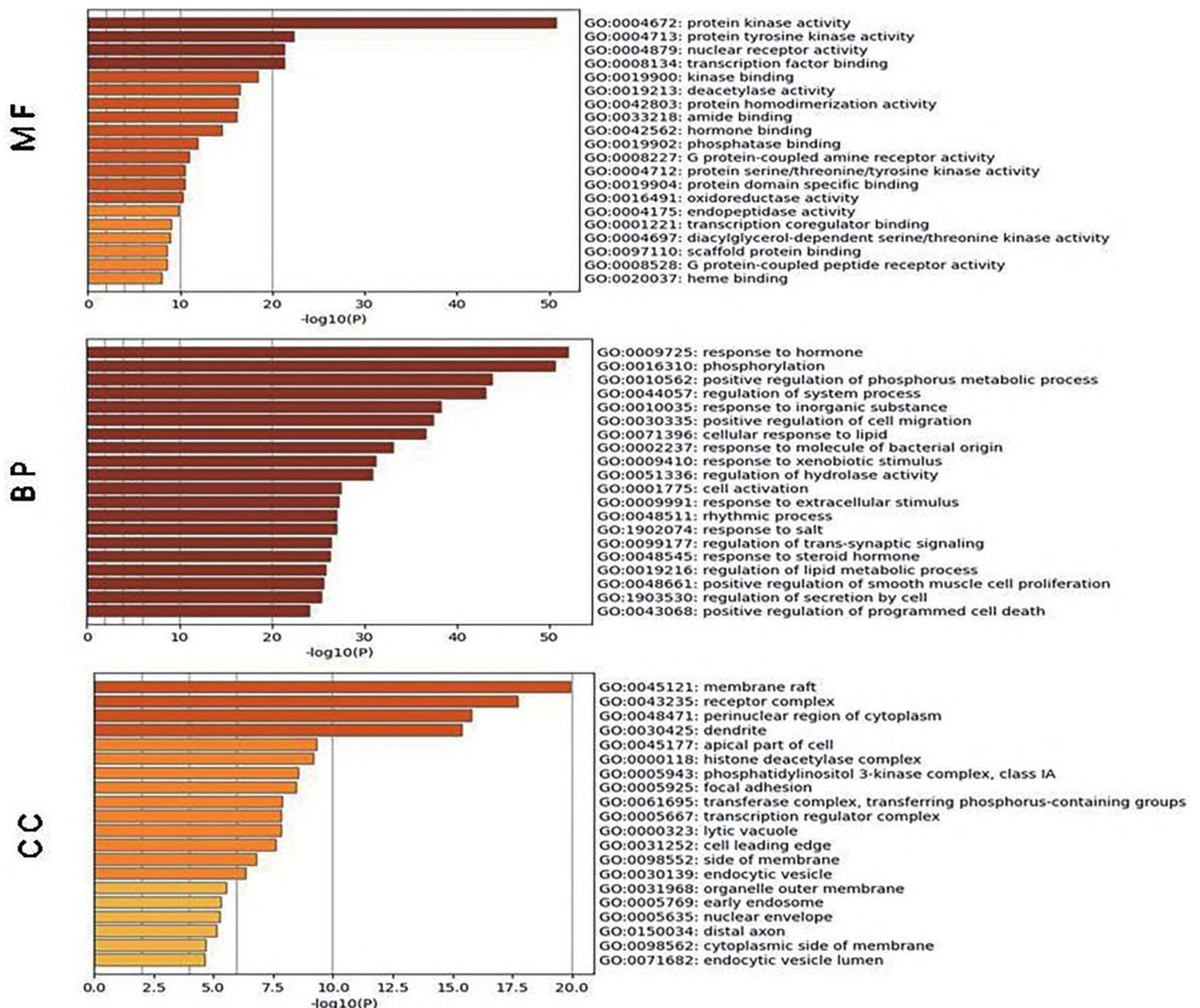


图4 参芪扶正液治疗心肌损伤作用靶点 GO 富集分析结果

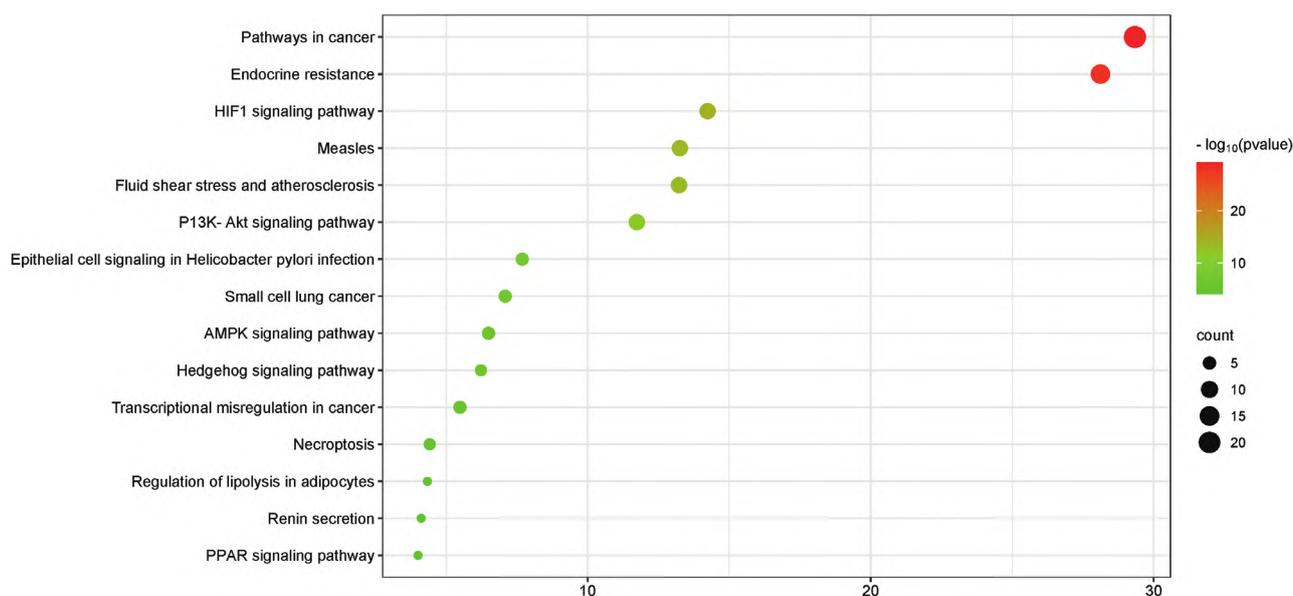


图5 参芪扶正液治疗心肌损伤作用靶点KEGG富集气泡图

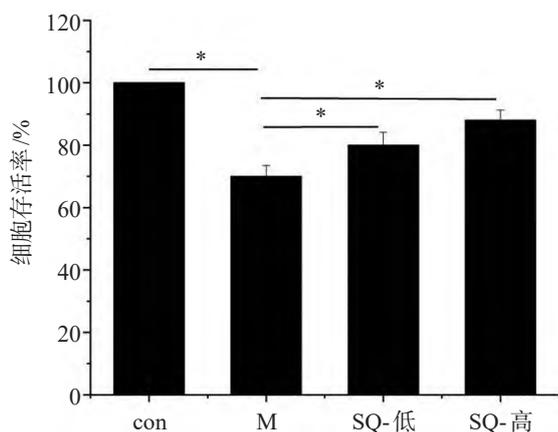


图6 参芪扶正液对损伤心肌细胞存活率的影响 (* $P<0.05$)

组比较, SQ-低组和SQ-高组细胞凋亡率均有不同程度降低 ($P<0.05$), 以上结果表明参芪扶正液能减轻高糖诱导心肌细胞凋亡(图7)。

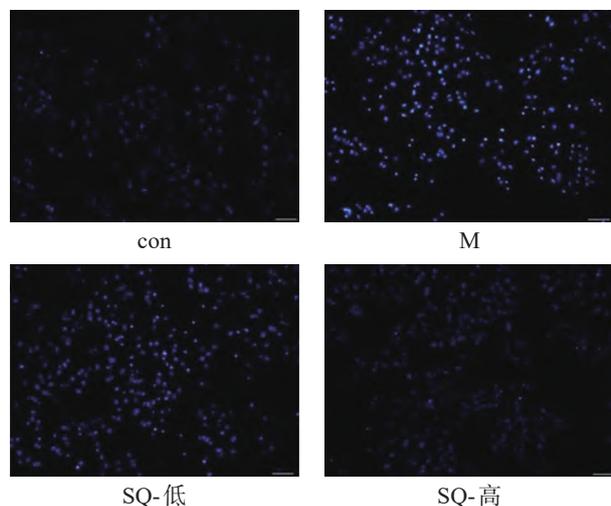
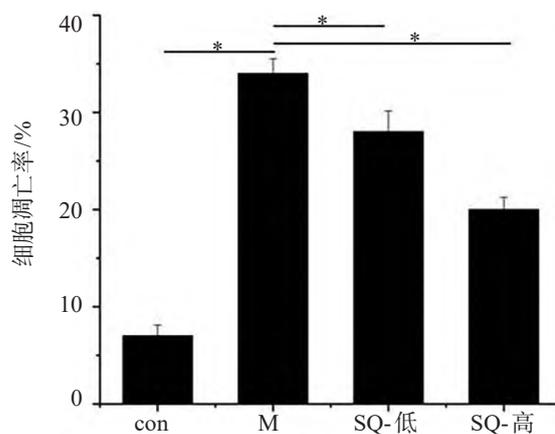


图7 参芪扶正液对损伤心肌细胞凋亡的影响 (* $P<0.05$)

2.6.3 参芪扶正液对损伤心肌细胞关键基因蛋白表达的影响 通过 Western blot 对 PI3K/AKT 信号通路相关蛋白进行检测, 结果发现和 con 组相比, M 组 H9c2 细胞中 p-AKT 和 p-P13K 蛋白表达明显下调; 而 SQ-低组和 SQ-高组 p-AKT 和 p-P13K 蛋白表达上调 ($P<0.05$), 表明参芪扶正液减轻高糖诱导的心肌损伤作用可能与其上调 AKT 和 P13K 蛋白表达有关(图8)。

3 讨论

心肌损伤是常见心血管并发症之一, 严重影响患者的生活质量和生命安全。高血糖是导致心肌损伤的常见诱因之一, 血液中高糖水平可导致心肌细胞肥大、凋亡、坏死, 间质纤维化沉积增加^[6]。参芪扶正液是由



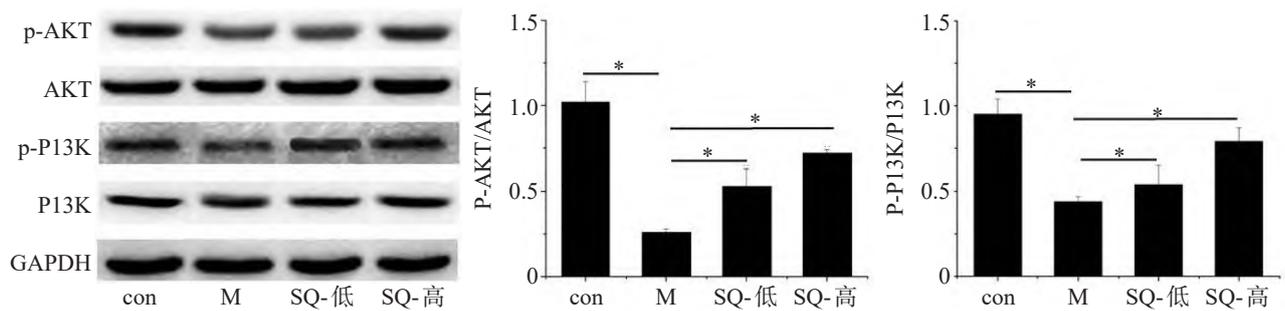


图8 参芪扶正液对损伤心肌细胞PI3K/AKT信号通路蛋白表达的影响 (* $P < 0.05$)

传统中药党参、黄芪组成,具有益气扶正、改善心肌供血能力,提高机体免疫力、增效减毒等作用^[7-8]。

本研究首先筛选出黄芪的活性成分 20 种、党参的活性成分为 21 种,共得到 495 个有效活性成分对应的靶标,并于心肌损伤相关靶点取交集基因,最终筛选出以 AKT1、IL6、SRC、STAT3 和 EGFR 等为核心的 36 个参芪扶正液干预心肌损伤的作用靶标和 PI3K/AKT、NF- κ B 和 PPAR 等信号通路。体外细胞实验证实,参芪扶正液可提高高糖诱导的心肌细胞损伤的存活率,并且可使损伤心肌细胞的 AKT 和 P13K 蛋白的磷酸化表达上升。PI3K 是一种磷脂酰肌醇 3-激酶,当 PI3K 被激活时,它可以进一步加速 AKT 的活化过程。活化后的 AKT 的磷酸化可以激活或抑制其下游的目标蛋白,而通过 PI3K/AKT 信号途径,可以调控与凋亡相关的蛋白如 Bax、BAD、Bcl-2 和 Caspase-9 等,从而有效地抑制细胞凋亡^[9-10]。本研究结果提示参芪扶正液可能通过 PI3K/AKT 信号通路,调节 AKT 和 P13K 水平,进而发挥对高糖诱导的心肌细胞损伤的保护作用。

综上所述,本项研究针对参芪扶正液与心肌损伤疾病之间的多元网络成分进行了深入探究,明确了参芪扶正液在心肌损伤疾病中的潜在活性成分、关键作用靶点,以及与之相关的主要信号传导途径。然而,本研究仍然存在一些局限性,后期将通过进一步的相关实验,探究参芪扶正液在心肌损伤中的具体作用及相关分子机制,为进一步深化对其作用机制的理解提供了全新的视角。

参考文献:

- [1] NAKAMURA M, SADOSHIMA J. Cardiomyopathy in obesity, insulin resistance and diabetes[J]. *J Physiol*, 2019, 598(14): 2977-2993.
- [2] HE J, LIU D, ZHAO L, et al. Myocardial ischemia/reperfusion injury: Mechanisms of injury and implications for management (Review) [J]. *Exp Ther Med*, 2022, 23(6): 430.
- [3] 何靖,黎耀和,余莹,等. 参芪扶正注射液防治药物心脏毒性的网络药理学作用机制研究[J]. *中成药*, 2020, 42(9): 2488-2495.
- [4] 赵嘉兰,盛小燕,黎赛,等. 基于网络药理学探讨参芪扶正注射液防治阿霉素心脏毒性的作用机制[J]. *今日药学*, 2021, 31(7): 508-513.
- [5] 隆耀莹,徐柳月,唐晓琼,等. 参芪扶正注射液防治萘环类药物心脏毒性的 Meta 分析[J]. *检验医学与临床*, 2019, 16(11): 1550-1554.
- [6] LIU Q, WANG S, CAI L. Diabetic cardiomyopathy and its mechanisms: Role of oxidative stress and damage[J]. *J Diabetes Investig*, 2014, 5(6): 623-634.
- [7] 王志英. 美托洛尔联合参芪扶正注射液治疗慢性心力衰竭的疗效观察[J]. *北方药学*, 2016, 13(9): 75-76.
- [8] 郝翠. 参芪扶正抗心肌缺血的网络药理学研究[D]. 浙江: 浙江大学, 2016.
- [9] 李颖,吴曼,陈智,等. 秋水仙碱通过激动 PI3K/AKT/eNOS 信号通路对急性心肌梗死大鼠心功能的影响[J]. *中西医结合心脑血管病杂志*, 2024, 22(7): 1219-1224.
- [10] 张跃伟,孙锁柱,张丹,等. 氨磷汀对急性放射性肠炎小鼠 VEGF、bFGF 和 PI3K/PKB 通路 mRNA 表达的影响[J]. *中国现代医学杂志*, 2020, 30(4): 1-9.

(责任编辑:林加西)