

基于疾病模块分析的大株红景天注射液治疗冠心病心绞痛气虚血瘀证的研究

薛莲¹, 董鑫², 赵辰羲², 于雪³, 张淑静³, 李平¹, 周雪忠², 杨阳⁴

(1. 北京中医药大学第三附属医院, 北京 100029; 2. 北京交通大学计算机与信息技术学院, 北京 100044; 3. 北京中医药大学中医学院, 北京 100020; 4. 北京中医药大学第三附属医院, 北京 100029)

摘要: **目的** 揭示大株红景天注射液治疗冠心病心绞痛气虚血瘀证的药理机制, 并运用细胞实验初步验证预测结果的可靠性。**方法** 从生物医学数据库和国内外文献中筛选出大株红景天注射液的主要化学成分及其作用靶点; 通过 GeneCards 数据库、MalaCards 数据库筛选出气虚血瘀证、心绞痛基因, 采用 DIAMOnD 算法构建心绞痛疾病模块; 对“心绞痛-气虚血瘀证-大株红景天注射液”网络的核心靶点进行基因功能富集分析, 得到关键通路。最后, 进行细胞实验验证大株红景天注射液对缺氧 H9C2 心肌细胞关键通路蛋白表达的影响。**结果** 筛选出大株红景天注射液主要的化学成分 7 个, 共获得靶点 362 个; 筛选出 232 个已知心绞痛基因, 通过构建心绞痛疾病模块, 增加了 100 个预测得到的心绞痛基因; 得到气虚血瘀证症状相关基因 2 960 个。网络拓扑分析得到大株红景天注射液治疗冠心病心绞痛气虚血瘀证的核心靶点有 STAT3、EGFR、TNF、IL-6 等共 30 个; 基因功能富集分析获得通路 82 条。结合以往文献研究分析显示 STAT3 靶点和 JAK2/STAT3 通路可能是大株红景天注射液治疗冠心病心绞痛气虚血瘀证的关键作用通路。细胞实验结果显示, 与模型组比较, SI 组及尼可地尔组 JAK2、STAT3 的 mRNA 表达均显著降低 ($P < 0.05$); JAK2、STAT3 的蛋白表达显著下降 ($P < 0.05$)。**结论** 通过疾病模块和细胞实验验证发现 STAT3 是冠心病心绞痛气虚血瘀证病理机制的关键基因, JAK2/STAT3 是大株红景天注射液治疗冠心病心绞痛气虚血瘀证的核心通路, 表明了本研究结合疾病模块进行药物治疗病证的有效性和新颖性。

关键词: 网络药理学; 疾病模块; 冠心病心绞痛; 气虚血瘀证; 大株红景天注射液

中图分类号: R286 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-0482(2024)12-1430-11

DOI: 10.14148/j.issn.1672-0482.2024.1430

引文格式: 薛莲, 董鑫, 赵辰羲, 等. 基于疾病模块分析的大株红景天注射液治疗冠心病心绞痛气虚血瘀证的研究[J]. 南京中医药大学学报, 2024, 40(12): 1430-1440.

Study on the Treatment of Qi Deficiency and Blood Stasis Syndrome of Coronary Heart Disease Angina Pectoris with Sofren Injection Based on Disease Module Analysis

XUE Lian¹, DONG Xin², ZHAO Chenxi², YU Xue³, ZHANG Shujing³, LI Ping¹, ZHOU Xuezhong², YANG Yang⁴

(1. The Third Affiliated Hospital of Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China; 2. School of Computer and Information Technology, Beijing Jiaotong University, Beijing 100044, China; 3. School of Chinese Medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100020, China; 4. The Third Affiliated Hospital of Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To reveal the pharmacological mechanism of Sofren Injection in the treatment of Qi deficiency and blood stasis syndrome of angina pectoris in coronary heart disease, and to preliminarily verify the reliability of the prediction results by cell experiments. **METHODS** Firstly, we screened the main chemical components of Sofren injection and their targets from biomedical databases and literature. Then, using the DIAMOnD algorithm, we constructed the angina disease module by screening Qi deficiency and blood stasis syndrome-related genes from the GeneCards and MalaCards databases. Next, we conducted gene functional enrichment analysis of the core targets in the “angina pectoris - Qi deficiency and blood stasis - Sofren Injection” network to identify key pathways. Finally, we performed cell experiments to verify the effect of Sofren Injection on the expression of key pathway proteins in hypoxic H9C2 cardiomyocytes. **RESULTS** We identified 7 main chemical components of Sofren Injection, targeting a total of 362 genes. We screened 232 known angina pectoris-related genes and added 100 predicted genes by constructing the angina pectoris disease module. A total of 2 960 genes related to Qi deficiency and blood stasis syndrome were obtained. Network topological analysis revealed 30 core targets for Sofren Injection in treating coronary heart disease angina pectoris with Qi deficiency and blood stasis syndrome, including STAT3, EGFR, TNF, and IL-6. Gene functional enrichment analysis identified 82 pathways. Literature analysis

收稿日期: 2024-03-06

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(82374302, 82174533, 81960852)

第一作者: 薛莲, 女, 博士研究生, E-mail: frendaxue@126.com

通信作者: 李平, 女, 主任医师, 主要从事心血管病研究, E-mail: pearl2008@126.com;

杨阳, 男, 副主任医师, 主要从事心血管病研究, E-mail: zsp0501@sina.com

combined with the results indicated that STAT3 and the JAK2/STAT3 pathway might be key pathways for Sofren Injection in treating coronary heart disease angina pectoris with Qi deficiency and blood stasis syndrome. Cell experimental results showed significant decreases in mRNA and protein expression of JAK2 and STAT3 in the SI group and the nicorandil group compared to the model group ($P < 0.05$). **CONCLUSION** Disease module analysis and cell experiments confirm that STAT3 is a key gene in the pathological mechanism of coronary heart disease angina pectoris with Qi deficiency and blood stasis syndrome, and the JAK2/STAT3 pathway is a core pathway for Sofren Injection in treating this condition. This study demonstrates the effectiveness and novelty of combining disease module for mining the treatment of TCM formulas with specific disease and syndrome.

KEYWORDS: network pharmacology; disease module; coronary heart disease angina pectoris; syndrome of qi deficiency and blood stasis; Sofren Injection

冠心病心绞痛 (AP) 是因冠状动脉供血不足心肌短暂性缺血缺氧引起胸闷、胸痛的症状,是冠状动脉粥样硬化性心脏病最常见的临床表现^[1]。中医学理论认为不同体质的人群患冠心病心绞痛会出现不同兼症,这就是疾病的不同证型^[2],根据不同证型给予对症的药物可以更有效的治疗疾病。中医认为冠心病心绞痛存在不同证型,其中,气虚血瘀证是冠心病心绞痛最常见的证型^[3]。气虚血瘀证以胸闷、气短、乏力、心悸、舌紫暗、脉细涩等为主要临床表现^[4]。大株红景天注射液是由大株红景天经提取、分离、精制、膜过滤制成而成^[5]的单药注射液,具有益气固本、活血化瘀的功效。临床应用大株红景天注射液治疗冠心病心绞痛气虚血瘀证已有 15 年余,其疗效显著、安全性高^[6]。多项临床随机对照实验表明,大株红景天注射液能够降低冠心病心绞痛患者血清 ICAM-1、IL-6、hs-CRP、PT、APTT、FIB 和 MMP-9 的水平,改善患者胸闷、气短、心悸等症状^[7-9]。尽管大株红景天注射液对冠心病心绞痛气虚血瘀证的治疗效果已被证明,但是其作用机制尚不清晰。

网络药理学是通过高通量组学数据分析、计算机模拟等现代化技术,结合生物学、基因组学、蛋白质组学等多学科理论,系统揭示“药物-靶点-疾病”相互作用的网络关系,是明确药效物质基础、预测药物作用机制的一门新兴学科^[10]。目前网络药理学方法已被广泛运用到中医药领域的研究^[11],如中药成分的分析^[12],中医疾病的病理机制^[13-14]、中药治疗疾病的作用机制^[15-16]等。然而,这些研究主要是基

于对疾病和药物的交集基因进行网络拓扑分析和基因功能分析,从而展现出药物与疾病的联系。这种方法局限于当下的研究水平,不能全部找出与疾病有关的基因,因此,网络药理学研究结果的准确性受到了限制^[17]。疾病模块的研究正是将已知的疾病基因作为种子基因,运用 DIAMOnD 算法在蛋白质相互作用网络 (PPI) 中分析出与疾病联系紧密的包括已知和未知的所有基因,补充了原有疾病基因的不完备性^[11]。运用疾病模块筛选出更全面更核心的疾病基因作为研究基础,可以有效弥补现有网络药理学的不足,从而更精确的阐释药物治疗疾病的作用机制。

中医通过病证结合的角度认识疾病,认为同一种疾病因人体气血阴阳的不同而分为不同的证型。比如冠心病心绞痛可以分为气虚血瘀证、痰湿内阻证、痰热扰心证等^[12],不同的证型有不同的治疗方法,这与西医用同一类药物治疗同一种疾病有所不同。当前对中医治疗疾病机制的网络药理学研究仍停留于对疾病层面的分析,而没有涉及到中医证型的水平。因此,将疾病和中医证候相关的基因纳入网络药理学机制研究中,即病证结合研究模式,更符合中医研究规律,得出的预测结果可能更精准。

本研究采用心绞痛疾病模块方法,从病证结合的角度运用网络药理学方法对大株红景天注射液治疗心绞痛气虚血瘀证的病理机制进行探讨,并通过细胞实验对结果进行初步验证;为大株红景天注射液治疗心绞痛气虚血瘀证提供理论依据,为中药治疗疾病的作用机制探索新的研究方法 (图 1)。

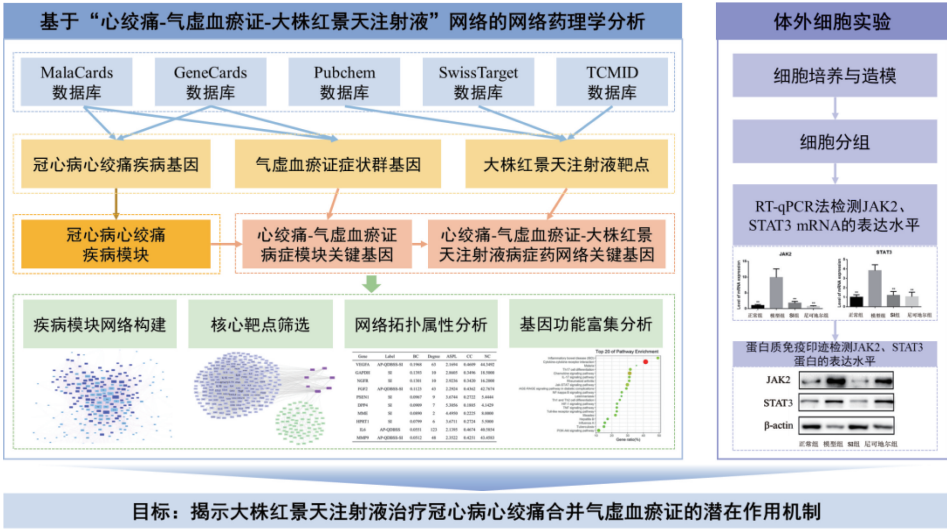


图 1 研究框架

Fig. 1 Research framework

1 材料与方法

1.1 网络药理学研究

1.1.1 大株红景天注射液主要成分及作用靶点筛选 查阅国内外文献及检索中医药综合数据库 (TCMID, <http://www.megabionet.org/tcmid/>) 确认大株红景天注射液的主要化学成分,通过 Pubchem 数据库检索得到化学成分的 Canonical SMILES 字符串 (每个化合物的唯一 SMILES 字符串);将 SMILES 字符串输入 SwissTarget 数据库 (<http://www.swisstargetprediction.ch/>),检索、合并、去重后得到大株红景天注射液的作用靶点。

1.1.2 心绞痛相关基因筛选 将心绞痛相关英文名称“Angina”“Unstable angina”输入 GeneCards 数据库,检索并筛选出最相近病名“Angina”,将最相近病名输入 MalaCards 数据库,检索出心绞痛的相关基因 (Genes for Angina pectoris)。

1.1.3 气虚血瘀证相关基因筛选 根据《中药新药临床研究指导原则》^[18] 确定气虚血瘀证的症状群,通过 GeneCards 数据库检索并筛选出每种症状最相近病名、将最相近病名输入 MalaCards 数据库检索出每种症状的相关基因,如乏力“weakness”、气短“shortness of breath”等。

1.1.4 心绞痛疾病模块的构建 将心绞痛现有基因作为种子基因,采用 DIAMOnD 算法来构建心绞痛疾病模块。DIAMOnD 算法预测了 PPI 中与输入疾病基因密切相关的其他基因。将原有基因与预测基因结合,形成蛋白网络水平的心绞痛疾病模块。具体而言,本研究以冠心病心绞痛的现有基因 (即

种子基因) 作为输入,映射到 PPI 网络中,在 PPI 网络背景下基于 DIAMOnD 算法迭代一轮形成 1 个新增基因,并将此新增基因加入原始基因中,再次迭代算法形成新增基因,以此方式迭代若干轮,直至新增基因的显著性 P 值不满足 $P < 0.05$ 的条件或候选基因集为空时停止迭代。

1.1.5 “病-证-药”分子网络构建 将心绞痛、气虚血瘀证、大株红景天注射液的基因合并去重,将去重后的基因列表导入 STRING 数据库 (<https://www.string-db.org/>),选择物种为“Homo sapiens”,条件设为“Combined score > 0.7 ”,下载 PPI 网络数据并导入 CytoScape 软件,进一步构建 PPI 网络图。利用 CytoScape 软件中“Tools” (工具栏) 下“Network analyzer”选项进行网络拓扑结果分析。根据度值及相关性进一步分析“病-证-药”的核心靶点。

1.1.6 “病-证-药”KEGG 富集分析和基因功能 (GO) 分析 将“病-证-药”基因的交集作为输入,调用 SymMap 数据库 (<https://www.symmap.org/>) 接口进行 KEGG 富集分析,GO 功能分析。GO 功能分析主要包括生物过程 (Biological process, BP)、细胞组成 (Cellular component, CC) 以及分子功能 (Molecular function, MF)。筛选 KEGG 和 GO 富集分析前 20 项结果制成可视化气泡图。

1.2 体外实验研究

1.2.1 实验材料

1.2.1.1 实验细胞 H9C2 心肌细胞系购买于国家实验细胞资源共享平台 (北京协和细胞资源中心,中国),是乳鼠心肌细胞系。

1.2.1.2 药物与试剂 大株红景天注射液(Z20060362,通化玉圣药业有限公司),尼可地尔(H41024517,天方药业有限公司),胎牛血清(批号:10099141C,Gibico),JAK2(货号:60225-1-Ig,proteintech)、STAT3(货号:10253-2-AP,proteintech)、MASSON 染色试剂盒(批号:G1346,索莱宝),FITC 试剂盒(批号:CA1620,索莱宝)等。

1.2.1.3 实验仪器 TS2R-FL 型倒置荧光显微镜(日本尼康),CPOCH 型全波长酶标仪(美国 Biotek),160i 型三气培养箱(德国 Thermo Fisher Scientific),Revolve FL 型正倒置一体荧光显微镜(美国 Echo)。

1.2.2 实验方法

1.2.2.1 细胞培养与造模 从液氮罐中取出细胞株进行复苏,用含 10% 胎牛血清、1% 青霉素-链霉素溶液的 DMEM 高糖培养基培养 H9C2 心肌细胞,将培养瓶静置于 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养。当传代至 2~3 代时,观察细胞的生长状态。细胞培养状态良好,将细胞按照 5×10⁴ mL⁻¹,分别接种于 96 孔板,当细胞生长至 80% 饱和度时,正常组细胞放在普通 CO₂ 培养箱,将模型组细胞放在三气培养箱中进行 1、4、12、24、30 h 缺氧造模,根据细胞存活率选择最佳造模时间。

1.2.2.2 细胞分组 实验分为正常组、模型组、大株红景天注射液组(SI 组)和尼可地尔组。正常组:DMEM 高糖培养基普通 CO₂ 培养箱 24 h;模型组:三气培养箱缺氧缺糖干预造模培养 24 h;SI 组:缺氧缺糖培养,CCK8 法摸索大株红景天注射液最佳浓度后,干预 24 h;尼可地尔组:缺氧缺糖培养,CCK8 法摸索药物作用最佳浓度后干预 24 h。

1.2.2.3 qPCR 法检测 JAK2、STAT3 mRNA 的表达水平 在各组细胞中加入 1 mL 裂解液,采用离心柱法提取总 RNA,进行浓度和纯度测定,选取 2 μg 总 RNA 进行逆转录,反应体系为 20 μL。运用 qPCR 法扩增,40 个循环结束后参照基因 ΔΔCt 法计算目的基因 mRNA 表达的相对含量。所用引物由江苏金唯智公司合成,序列见表 1。

1.2.2.4 蛋白质免疫印迹检测 JAK2、STAT3 蛋白的表达水平 提取用含有蛋白酶和磷酸酶抑制剂鸡尾酒的 RIPA 裂解缓冲液提取细胞蛋白。用 BCA 测定蛋白浓度。40 μg 总蛋白在 10% SDS 聚丙烯酰胺凝胶上溶解,并转移到聚偏二氟乙烯(PVDF)膜上。转移后,用 5% 脱脂牛奶封闭膜,然后将 PVDF

与一抗(兔抗 STAT3、1:1 000;兔抗 JAK2、1:1 000;兔抗 β-actin,1:30 000)在 4℃ 下孵过夜,TBST 洗膜 5 min×5 次,PVDF 膜与辣根过氧化物酶偶联抗体一起孵育(1:10 000,室温下孵育 1 h)。最后,使用 ECL 观察条带,并使用多功能成像系统进行成像。以 β-actin 的表达作为内源性对照。

表 1 荧光定量 PCR 的引物

Table 1 Primers of fluorescence quantitative PCR		
引物名称	序列	退火温度/℃
JAK2	F:CTGGCTGTCTATAACTCCATCAG	60
JAK2	R:CCTGCGGAATCTGTACCTTATC	
Stat3	F:ACCCAGATCCAGTCTGTAGAA	60
Stat3	R:GGAATGTCAGGGTAGAGGTAGA	
β-actin	F:ACCGTGAAAAGATGACCCAGAT	60
β-actin	R:CCAGAGGCATACAGGGACAA	

1.2.2.5 统计学方法 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用统计学软件 SPSS 27.0 进行统计学分析。多组间比较,数据呈正态分布,且方差齐时运用单因素方差分析,两组间比较用 LSD 检验;数据非正态分布或/方差不齐时采用非参检验或单因素方差分析 Dunnett's T3 法进行, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 网络药理学结果

2.1.1 大株红景天注射液主要成分及作用靶点筛选 检索得到大株红景天注射液主要化学成分 7 个,分别是红景天苷、没食子酸、酪醇、对羟基苯甲酸、对香豆酸、络塞定和对羟基苯甲醛。分别筛选出有效靶点红景天苷 107 个、没食子酸 100 个、酪醇 111 个、对羟基苯甲酸 104 个、对香豆酸 102 个、络塞定 109 个和对羟基苯甲醛 81 个,合并去重后得到 362 个靶点。

2.1.2 心绞痛、气虚血瘀证相关基因筛选 根据 GeneCards 数据库筛选出与“心绞痛”“气虚血瘀证”相关症状最相近的名词,将最这些名词输入 MalaCards 基因数据库再次检索,共筛选出基因心绞痛 232 个,气虚血瘀证相关基因 2 960 个。其中气虚血瘀证相关症状所涉及的基因数目统计如下表 2 所示。

2.1.3 心绞痛疾病模块的构建 将已获取的 232 个心绞痛基因作为种子基因,运用 DIAMOnD 算法对候选节点进行排序,考虑到心绞痛种子基因数目以及预测基因的显著性 P 值情况,本研究进行了 100 次迭代,得到算法预测的 100 个基因作为新增

基因,其中包含了基因的名称及其对应的 P 值。随后,我们将这 100 个基因与已有的 232 个基因结合起来并导入到 STRING 数据库中,形成一个 PPI 分子网络,作为最终的心绞痛疾病模块,共获取 332 个心绞痛基因。新生成的 100 个基因中前 20 个基因,按 P 值升序排列,如表 3 所示。

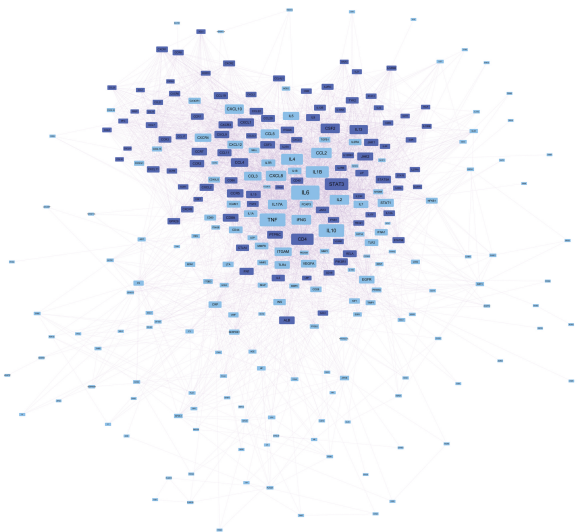
表 2 气虚血瘀证主要症状基因数目统计
Table 2 Statistics of the number of genes of Qi deficiency and blood stasis syndrome main symptoms

症状	基因计数
乏力	537
喘憋	2 106
心悸	70
气短	222
胸痛	167
血瘀	10

值得注意的是,所有 100 个新生成的基因 P 值

表 3 DIAMOnD 算法新筛选出的前 20 位基因
Table 3 Top 20 genes newly selected by DIAMOnD algorithm

排序	基因名称	P 值	排序	基因名称	P 值
1	ALB	3.47E-54	11	CCL4	5.21E-40
2	CD4	1.34E-45	12	CD8A	3.39E-39
3	STAT3	1.03E-42	13	IL15	2.09E-39
4	FN1	3.75E-41	14	IL9	1.66E-39
5	IL13	2.99E-40	15	ITGAX	2.06E-38
6	CXCL1	2.66E-41	16	CCL4L1	9.25E-36
7	CSF2	2.46E-41	17	CCR5	1.45E-35
8	VCAM1	2.61E-40	18	CD86	1.08E-36
9	PTPRC	1.48E-41	19	CTLA4	1.93E-36
10	CSF3	6.02E-39	20	CD40	6.67E-38



注:图中浅蓝色节点表示冠心病心绞痛的已有基因(种子基因),紫色节点表示经过 DIAMOnD 算法预测得到的新增基因。图中节点的大小代表了节点的度值。

图 2 冠心病心绞痛疾病模块
Fig. 2 Disease module of coronary heart disease angina pectoris

表 4 冠心病心绞痛疾病模块基因拓扑属性(根据度值降序前 20 名)

Table 4 Gene topological attributes of disease module of coronary heart disease angina pectoris (top 20 in descending order of degree value)

基因名称	标签	度值	ASPL	BC	CC	NC
IL6	种子基因	137	1.538 5	0.068 0	0.650 0	43.956 2
TNF	种子基因	122	1.593 4	0.058 1	0.627 6	45.836 1
IL10	种子基因	120	1.644 7	0.031 3	0.608 0	47.416 7
STAT3	预测基因	108	1.681 3	0.047 6	0.594 8	46.398 1
IL1B	种子基因	105	1.685 0	0.031 0	0.593 5	48.476 2
CD4	预测基因	102	1.728 9	0.043 9	0.578 4	48.313 7
IL4	种子基因	98	1.765 6	0.015 3	0.566 4	51.081 6
CXCL8	种子基因	90	1.780 2	0.021 5	0.561 7	52.366 7
CCL2	种子基因	90	1.765 6	0.025 2	0.566 4	52.244 4
IFNG	种子基因	85	1.805 9	0.009 6	0.553 8	53.670 6
IL2	种子基因	84	1.805 9	0.010 7	0.553 8	53.690 5
CSF2	预测基因	82	1.860 8	0.007 4	0.537 4	54.939 0
CXCL10	种子基因	81	1.912 1	0.008 5	0.523 0	54.172 8
IL17A	种子基因	81	1.838 8	0.010 1	0.543 8	53.246 9
CCL5	种子基因	77	1.897 4	0.008 5	0.527 0	55.922 1
IL13	预测基因	77	1.882 8	0.014 0	0.531 1	51.987 0
CCL3	种子基因	72	1.959 7	0.007 5	0.510 3	56.611 1
CCL4	预测基因	71	1.948 7	0.007 1	0.513 2	57.070 4
ITGAM	种子基因	70	1.890 1	0.022 1	0.529 1	50.728 6
CXCR4	种子基因	67	1.882 8	0.021 6	0.531 1	46.358 2

2.1.4 “病-证-药物”分子网络构建 首先,根据心绞痛疾病模块和气虚血瘀证的相关基因形成“心绞痛-气虚血瘀证”网络,其可视化结果如图 3 所示。其中紫色节点表示心绞痛与气虚血瘀证的基因交集,共 264 个,浅蓝色节点表示除交集外的心绞痛剩余基因,黄色节点表示除交集外的气虚血瘀证剩

余基因。将“病-证”网络根据度值的大小进行排序,度值排名前十位且为“病-证”交集基因的有 STAT3、EGFR、TNF、IL-6、PIK3R1,这 5 个基因与“病-证”联系最为紧密,可能是心绞痛气虚血瘀证发病机制的核心基因。

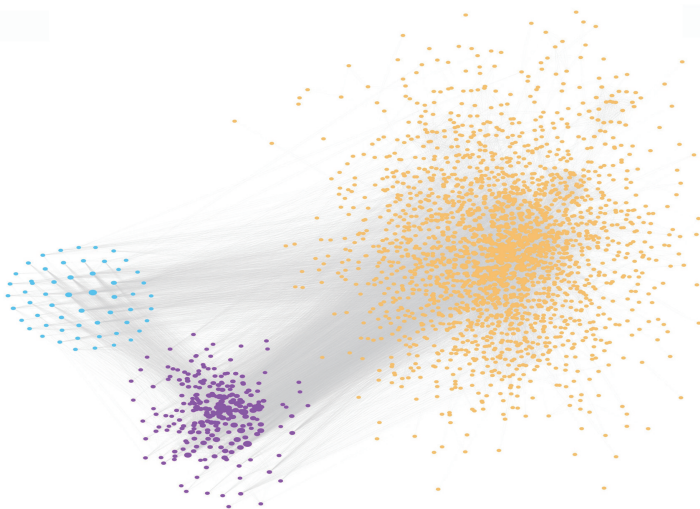


图 3 “心绞痛-气虚血瘀证”分子网络可视化

Fig.3 Visualization of molecular network of “angina pectoris-Qi deficiency and blood stasis syndrome”

在此基础上,我们利用 264 个“心绞痛-气虚血瘀证”的交集基因与 362 个大株红景天注射液的靶

点合并形成“心绞痛-气虚血瘀证-大株红景天注射液”网络,如图 4 所示。其中深紫色 30 个节点为疾病(心绞痛)、证候(气虚血瘀证)与药物(大株红景天注射液)的共同交集基因,浅紫色为心绞痛与气虚血瘀证除交集节点外的其他交集基因,浅绿色为

大株红景天注射液除交集以外的其他靶点。根据中心相关性排名获得前十位基因的拓扑属性指标,STAT3 不仅度值排名首位,并且为“病-证-药”的交集基因,因此,它可能是大株红景天注射液治疗心绞痛气虚血瘀证的最关键靶点。

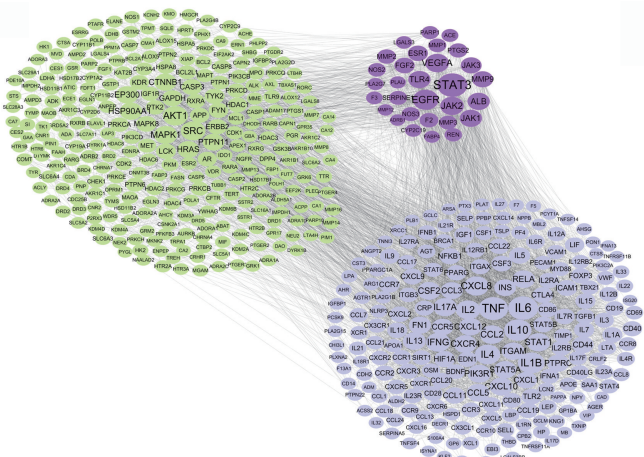
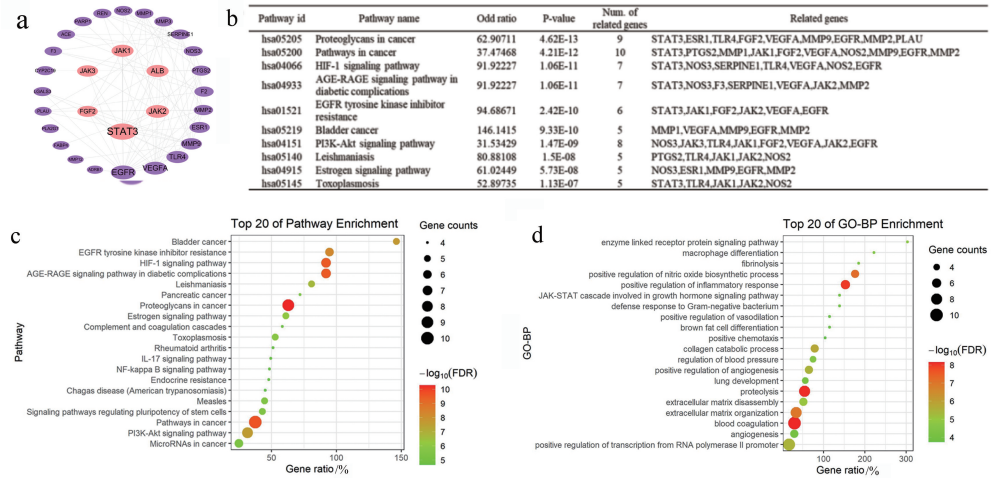


图 4 “病-证-药”分子网络可视化

Fig. 4 Visualization of molecular network of “disease-syndrome-drug”

2.1.5 “病-证-药”基因功能富集分析 我们首先筛选出“病-证-药”的交集基因(即 30 个交叉基因,形成了图 5(a)所示的分子网络。在这 30 个基因中,深紫色突出显示的 24 个基因代表源自心绞痛的种子基因,DIAMOnD 算法识别了其余 6 个粉红色基因。6 个新增基因表现出相对较高的度,并与其他 24 个节点表现出密切的关系。在 30 个靶点基础上,通过 SymMap 进行了基因功能富集分析,共富集到 82 条通路(图 5b 显示了前十条富集结果,按 P

值升序排列)。在图 5c 的气泡图中展示前 20 个富集结果。GO 富集分析结果包括三个不同水平:BP、MF 和 CC。BP 类别包括对酶结合的反应、炎症反应、与生长激素有关的 JAK-STAT 级联反应、RNA 聚合酶 II 启动子转录的正调控和凝血。CC 类 GO 术语包括 EGFR 因子、脂多糖受体、细胞表面和细胞核。MF 类别中的 GO 是一氧化氮合酶活性、药物结合、蛋白质结合和酶结合,见图 5(d)。



注:a.“病-证-药”的核心基因可视化网络图,其中紫色基因表示核心基因与现有疾病基因重叠的基因,粉色基因表示与新增疾病基因重叠的基因;b. 基因富集分析通路表;c. 基因富集分析通路气泡图;d. GO-BP 富集分析的气泡图。

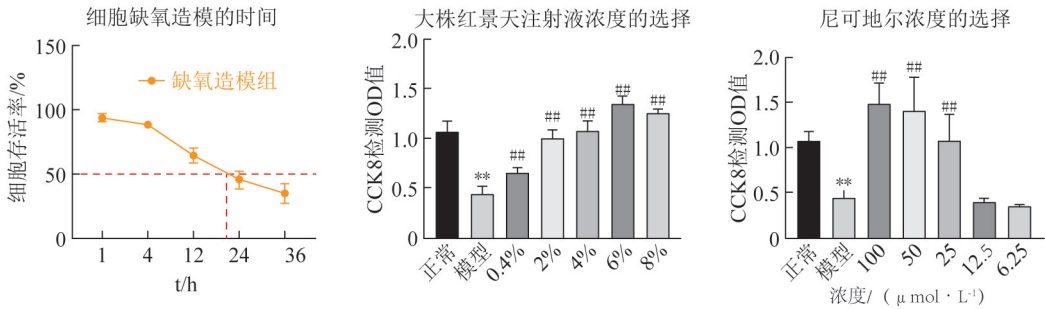
图 5 “病-证-药”基因功能富集分析

Fig. 5 Gene function enrichment analysis of “disease-syndrome-drug”

2.2 体外验证实验结果

2.2.1 细胞缺氧缺糖模型的建立及药物最佳作用浓度的选择 正常组细胞,随着造模时间延长,光密度值增加,模型组细胞,造模时间为1、4、8、12、24、30 h,细胞存活率为1 h(94.35%),4 h(93.85%),8 h(88.48%),12 h(64.43%),24 h(45.38%),30 h

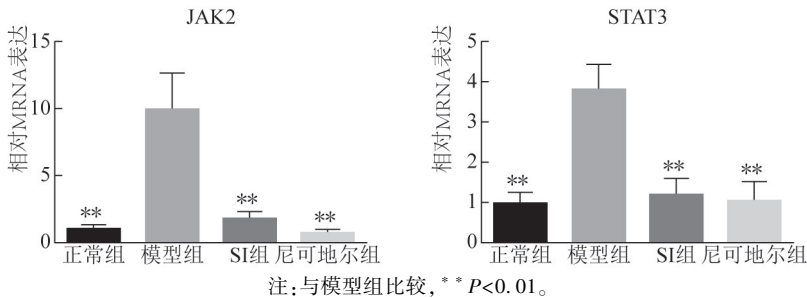
(35.02%),初步选定造模时间24 h,此时细胞存活率为50%左右。通过CCK8检测法,最终检测到大株红景天注射液对细胞保护的最佳作用浓度为6%,尼可地尔片的最佳保护作用浓度为100 μmol·L⁻¹,如图6。



注:与正常组比较, ** $P<0.01$;与模型组比较, ## $P<0.01$ 。
图6 造模时间选择、大株红景天注射液最佳浓度选择与尼可地尔最佳浓度的选择
Fig. 6 Selection of modeling time, selection of optimal concentration of Sofren Injection and selection of optimal concentration of Nicorandil

2.2.2 大株红景天注射液对缺氧心肌细胞 JAK2、STAT3 mRNA 表达水平的影响 与正常组比较,模型组中缺氧心肌细胞 JAK2、STAT3 蛋白及 mRNA 的表达升高,差异有统计学意义 ($P<0.01$);与模型组

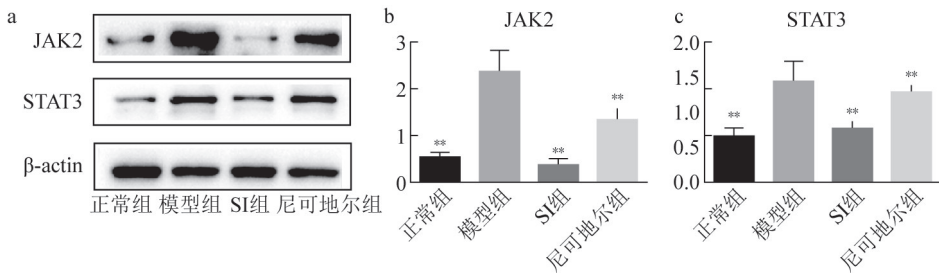
比较,SI 组和尼可地尔组 JAK2、STAT3 蛋白及 mRNA 的表达显著降低 ($P<0.01$);SI 组与尼可地尔组相比较,以上两项数值差异没有统计学意义 ($P>0.05$),结果见图 7。



注:与模型组比较, ** $P<0.01$ 。
图7 各组缺氧心肌细胞中 JAK2、STAT3mRNA 的表达情况
Fig. 7 Expression of JAK2 and STAT3 mRNA in hypoxic myocardial cells of each group

2.2.3 大株红景天注射液对缺氧心肌细胞 JAK2、STAT3 mRNA 蛋白表达的影响 与正常组比较,模型组中缺氧心肌细胞 JAK2、STAT3 蛋白的表达升高,差异有统计学意义 ($P<0.01$);与模型组比较,SI

组和尼可地尔组 JAK2、STAT3 蛋白的表达显著降低 ($P<0.01$);SI 组与尼可地尔组相比较,以上两项数值差异没有统计学意义 ($P>0.05$)。见图 8。



注:a. 各组缺氧心肌细胞中 JAK2、STAT3 蛋白表达比较;b. 不同组细胞中 JAK2 蛋白的表达情况;
c. 不同组细胞中 STAT3 蛋白的表达情况。与模型组比较, ** $P<0.01$ 。

图8 各组蛋白表达情况
Fig. 8 Protein expression of each group

3 讨论

网络药理学突破了“单药-单靶点”的研究模式,从系统生物学及生物网络平衡的角度通过分析药物、靶点、疾病之间的关系来揭示药物治疗疾病复杂的病理生理过程^[19,20]。然而,网络药理学的现有研究主要集中将疾病和药物的交集基因作为核心靶点,这种方法过度依赖于从交集中获得的“核心靶点”,这些靶点通常偏向于蛋白质-蛋白质相互作用网络中的枢纽节点,无法全面反映所研究疾病的核心机制。疾病模块的概念源于网络医学^[21],具有重要意义,它是指与某一疾病相关的蛋白或基因并非随机分散在网络中,而是在一套核心组织原则的关联下形成相互联系的功能亚群^[22]。疾病模块的构建使疾病基因得到了网络级扩展,使这些疾病基因之间的相互连接形成一个或多个子网络^[23]。疾病模块的研究方法从网络的角度更全面、更多维度地揭示疾病的作用机制,有效弥补了网药研究的不足。故本研究创新性的运用网络药理学结合疾病模块的研究方法,通过疾病模块预测了心绞痛相关基因,并筛选出了大株红景天注射液治疗心绞痛气虚血瘀证的核心通路。

本研究以心绞痛现有基因作为种子基因,采用 DIAMOnD 算法构建心绞痛疾病模块,最终得到 332 个心绞痛基因。我们首次利用心绞痛疾病模块与中医气虚血瘀证基因构建网络,并对网络中的基因进行全面分析,度值反映了基因之间的关联频次,度值越大的基因,表明与“病-证”联系越为紧密。我们发现 STAT3、EGFR、TNF、IL-6、PIK3R1,这 5 个基因是度值排名前十位且为“病-证”交集的基因,因此,它们可能是心绞痛气虚血瘀证发病机制的核心基因。Chang 等^[24]的研究表明,IL-6、AKT1、STAT3 可能是心绞痛气虚血瘀证的核心基因,这与本研究结论相一致。Bi 等^[25]基于网络药理学与分子对接技术探索发现,与心绞痛发病机制相关的基因有 IL-6、PTGS2、VEGFA、TNF 和 MAPK1,与心绞痛气虚血瘀证相关的通路有神经活性配体-受体通路、钙信号通路、癌症通路、cGMP-PKG 信号通路和 TNF 信号通路等。Guo 等^[26]的研究发现,这 TNF、TLR4、NFKB1 和 SERPINE1 4 个基因可能是心绞痛气虚血瘀证发病的关键基因。以上研究与本研究的部分结果相一致,一方面反映了疾病模块的有效性,另一方面本研究为心绞痛气虚血瘀证的发病机制提供了更全面的理论依据。

本研究首次结合心绞痛疾病模块筛选出大株红景天注射液治疗心绞痛气虚血瘀证的关键基因 30 个,根据中心性排名,前十位的基因有 STAT3、TNF、EGFR、AKT1、ALB、EP300、INS、GAPDH、IL6 和 SRC,其中 STAT3 度值最大排名居首。将 30 个关键基因进行相关性分析发现,STAT3、JAK1、JAK2、JAK3、ALB 和 FGF2 这 6 个基因与“病-证-药”联系最为紧密,表明这可能是大株红景天注射液治疗心绞痛气虚血瘀证的核心基因。既往文献研究认为,JAK1、JAK3 在类风湿关节炎、特应性皮炎、癌症等疾病中发挥作用^[27-29];ALB 是血浆中含量最多的蛋白质,是评价体内营养水平和肝损害的重要指标^[30-31];FGF2 是影响肝癌预后的独立危险因素^[32-33];而 JAK2、STAT3 参与多种心血管疾病病理生理反应^[34-36]。Marton 的研究认为 STAT3 是影响心血管疾病的重要因素^[37]。STAT3 是 JAK2 下游的调节蛋白,JAK2 被激活后使 STAT3 磷酸化,进一步激活心肌细胞中血管紧张素原基因启动子,血管紧张素原促进血管紧张素 II 的生成,血管紧张素 II 继续诱导 IL-6 家族成员 cardiotrophin-1 的合成,最终导致心肌细胞损伤^[38]。另有研究从细胞凋亡角度阐释,JAK2/STAT3 通路活化后,引发特定靶基因的表达增加,参与炎症、内皮细胞分化、血管生成,最终加速细胞凋亡^[39],导致心肌细胞缺血缺氧。有动物实验研究表明,通过调控 JAK2/STAT3 信号通路,抑制炎症反应和氧化应激,可以改善大鼠缺血性心律失常,增强心脏功能^[40]。本研究基因功能富集分析得到 82 条相关通路,根据 *P* 值排名,前五条通路中都出现了 STAT3, JAK2 也表达活跃,表明 JAK2、STAT3 通过多通路参与了大株红景天注射液治疗心绞痛气虚血瘀证的过程。

结合以上研究结果,我们认为 JAK2/STAT3 通路是大株红景天注射液治疗心绞痛气虚血瘀证的关键通路。为了验证这一推测,本研究继续进行了细胞实验。缺氧心肌细胞中加入大株红景天注射液后,JAK2 和 STAT3 的蛋白表达水平显著降低,提示大株红景天注射液通过调节 JAK2/STAT3 通路保护了心肌细胞完整性,起到了改善心绞痛的作用。此外,细胞实验的结果也为本研究中心绞痛疾病模块的构建提供了有力的验证,在疾病模块中,STAT3 作为新增基因中排序靠前的基因,显示了其与疾病模块中现有基因的较强关联,作为算法预测的结果,能够与细胞实验的结果有较好的呼应,这也显示出本

研究结合疾病模块进行疾病机制发现的有效性。

我们通过基因功能及富集分析还揭示了与大株红景天注射液治疗心绞痛气虚血瘀证相关的其他相关通路,包括肿瘤通路、HIF 信号通路、EGFR 酪氨酸激酶通路、PI3K-Akt 信号通路、IL-17 信号通路、NF- κ B 信号通路、VEGF 信号通路等,对这些通路的实验验证还有待进一步的研究。

4 结论

在本研究中,我们采用网络药理学结合疾病模块的方法和实验验证探讨了大株红景天注射液治疗心绞痛气虚血瘀证的作用机制。通过网络拓扑分析,得到心绞痛气虚血瘀证的核心基因包括 STAT3、EGFR、TP53 和 AKT1。我们证实大株红景天注射液通过降低 JAK2/STAT3 信号通路显著改善缺氧 H9C2 心肌细胞状态。这些发现为大株红景天注射液治疗冠心病心绞痛气虚血瘀证的病理机制提供了理论依据,验证了疾病模块方法的可靠性。

参考文献:

- [1] PANAGIOTAKOS D B, NOTARA V, KOUVARI M, et al. The Mediterranean and other dietary patterns in secondary cardiovascular disease prevention: A review[J]. *Curr Vasc Pharmacol*, 2016, 14 (5): 442-451.
- [2] 高喜旺,徐方易,苏颖,等. 基于五运六气理论对吉林省长春市地区冠心病发病人群先天体质研究[J]. *中华中医药杂志*, 2021, 36(2): 1114-1117.
GAO X W, XU F Y, SU Y, et al. Study on congenital constitution of coronary heart disease patients in Changchun, Jilin province based on the theory of five evolution phases and six climatic factors [J]. *China J Tradit Chin Med Pharm*, 2021, 36 (2): 1114-1117.
- [3] 其其格,王伟,胡立胜,等. 9790 例冠心病心绞痛辨证分型文献统计分析[J]. *山西中医*, 2008(10): 31-33.
QI Q G, WANG W, HU L S, et al. Statistical analysis of literature on syndrome differentiation and classification of 9790 cases of coronary heart disease and angina pectoris[J]. *Shanxi Tradit Chin Med*, 2008(10): 31-33.
- [4] ZHAI X, WANG X, WANG L, et al. Treating different diseases with the same method—a traditional Chinese medicine concept analyzed for its biological basis [J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11: 946.
- [5] 曹丽,刘晓妍,石岩硕,等. 大株红景天注射液在 PIVAS 集中配置后合理使用时间的研究[J]. *中国现代应用药学*, 2020, 37 (19): 2366-2370.
CAO L, LIU X Y, SHI Y S, et al. Study on the reasonable using time of sofren injection after drug allocation in PIVAS[J]. *Chin J Mod Appl Pharm*, 2020, 37(19): 2366-2370.
- [6] 李德恒,王天园,张会娜,等. 大株红景天注射液治疗冠心病心绞痛的有效性和安全性的系统评价[J]. *中国全科医学*, 2021, 24(26): 3359-3368.
LI D H, WANG T Y, ZHANG H N, et al. Systematic review of efficacy and safety of Rhodiola wallichiana injection in treating coronary heart disease and angina [J]. *Chin Gen Pract*, 2021, 24 (26): 3359-3368.
- [7] 王海洋,杨守忠,杨小青. 大株红景天注射液治疗冠心病稳定型心绞痛疗效及作用机制研究[J]. *中医药信息*, 2017, 34

- (6): 56-60.
- WANG H Y, YANG S Z, YANG X Q. Effect and mechanism of sofren injection in the treatment of stable angina pectoris [J]. *Inf Tradit Chin Med*, 2017, 34(6): 56-60.
- [8] 胡威,易日霞,李朋,等. 美托洛尔联合大株红景天注射液治疗冠状动脉粥样硬化性心脏病心力衰竭临床研究[J]. *中国药业*, 2018, 27(23): 59-61.
HU W, YI R X, LI P, et al. Clinical study on metoprolol combined with sofren injection in the treatment of heart failure induced by coronary heart disease [J]. *China Pharm*, 2018, 27(23): 59-61.
- [9] 王泰然,马巍,李彦,等. 大株红景天注射液对不稳定性心绞痛患者血清 ICAM-1 及 MMP-9 水平的影响[J]. *陕西医学杂志*, 2018, 47(10): 1340-1342.
WANG T R, MA W, LI Y, et al. Influence of Dazhu Hongjingtian injection on serum ICAM-1 and MMP-9 in patients with unstable angina pectoris [J]. *Shaanxi Med J*, 2018, 47(10): 1340-1342.
- [10] 庄延双,蔡宝昌,张自力. 网络药理学在中药研究中的应用进展[J]. *南京中医药大学学报*, 2021, 37(1): 156-160.
- ZHUANG Y S, CAI B C, ZHANG Z L. Application progress of network pharmacology in traditional Chinese medicine research [J]. *J Nanjing Univ Tradit Chin Med*, 2021, 37(1): 156-160.
- [11] NOGALES C, MAMDOUH Z M, LIST M, et al. Network pharmacology: Curing causal mechanisms instead of treating symptoms [J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2022, 43(2): 136-150.
- [12] YUE S J, XIN L T, FAN Y C, et al. Herb pair Danggui-Honghua: Mechanisms underlying blood stasis syndrome by system pharmacology approach [J]. *Sci Rep*, 2017, 7: 40318.
- [13] SHANG L R, WANG Y C, LI J X, et al. Mechanism of Sijunzi Decoction in the treatment of colorectal cancer based on network pharmacology and experimental validation [J]. *J Ethnopharmacol*, 2023, 302(Pt A): 115876.
- [14] WANG Y, YUAN Y, WANG W T, et al. Mechanisms underlying the therapeutic effects of Qingfei Yin in treating acute lung injury based on GEO datasets, network pharmacology and molecular docking [J]. *Comput Biol Med*, 2022, 145: 105454.
- [15] WANG Z Y, LI M Z, LI W J, et al. Mechanism of action of Daqinjiao decoction in treating cerebral small vessel disease explored using network pharmacology and molecular docking technology [J]. *Phytomedicine*, 2023, 108: 154538.
- [16] YE J H, LI L, HU Z X. Exploring the molecular mechanism of action of Yincheng Wuling Powder for the treatment of hyperlipidemia, using network pharmacology, molecular docking, and molecular dynamics simulation [J]. *Biomed Res Int*, 2021, 2021: 9965906.
- [17] JIASHUO W U, ZHANG F Q, ZHUANGZHUANG L I, et al. Integration strategy of network pharmacology in traditional Chinese medicine: A narrative review [J]. *Chung I Tsa Chih Ying Wen Pan*, 2022, 42(3): 479-486.
- [18] 中药新药临床研究指导原则[S]. 北京:中国医药科技出版社, 2002:77-85.
Guiding principles for clinical research of new Chinese medicine [S]. Beijing: China Medical Science and Technology Press, 2002:77-85.
- [19] World Federation of Chinese Medicine Societies. 网络药理学评价方法指南[J]. *世界中医药*, 2021, 16(4): 527-532.
World Federation of Chinese Medicine Societies. Network pharmacology evaluation methodology guidance [J]. *World Chin Med*, 2021, 16(4): 527-532.
- [20] LI S, ZHANG B. Traditional Chinese medicine network pharmacology: Theory, methodology and application [J]. *Chin J Nat Med*, 2013, 11(2): 110-120.
- [21] BARABASI A L, GULBAHCE N, LOSCALZO J. Network medicine: A network-based approach to human disease [J]. *Nat Rev Genet*, 2011, 12(1): 56-68.

- [22] YANG Y, YANG K, HAO T, et al. Prediction of molecular mechanisms for LianXia NingXin formula: A network pharmacology study[J]. *Front Physiol*, 2018, 9: 489.
- [23] GE Q, CHEN L, YUAN Y, et al. Network pharmacology-based dissection of the anti-diabetic mechanism of *Lobelia chinensis* [J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11: 347.
- [24] CHANG C, REN Y L, SU Q. Exploring the mechanism of Shexiang Tongxin dropping pill in the treatment of microvascular angina through network pharmacology and molecular docking[J]. *Ann Transl Med*, 2022, 10(18): 983.
- [25] BIS L, XU L, CHEN S Q, et al. Detection of herbal combinations and pharmacological mechanisms of clinical prescriptions for coronary heart disease using data mining and network pharmacology [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2021, 2021: 9234984.
- [26] GUO S Y, WU J R, ZHOU W, et al. Investigating the multi-target pharmacological mechanism of Danhong injection acting on unstable angina by combined network pharmacology and molecular docking[J]. *BMC Complement Med Ther*, 2020, 20(1): 66.
- [27] XUE C, YAO Q F, GU X Y, et al. Evolving cognition of the JAK-STAT signaling pathway: Autoimmune disorders and cancer [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2023, 8(1): 204.
- [28] 王静梅, 李荣, 冯先虎, 等. 新型 JAK1 抑制剂 abrocitinib 治疗青少年及成人中重度特应性皮炎的疗效及安全性的 Meta 分析 [J]. *中国临床药理学杂志*, 2023, 32(11): 836-845.
- WANG J M, LI R, FENG X H, et al. Meta-analysis of the efficacy and safety of a novel JAK1 inhibitor abrocitinib in the treatment of moderate-to-severe atopic dermatitis in adolescents and adults [J]. *Chin J Clin Pharm*, 2023, 32(11): 836-845.
- [29] ZHANG Y, WEI Y, JIANG S, et al. Traditional Chinese medicine CFF-1 exerts a potent anti-tumor immunity to hinder tumor growth and metastasis in prostate cancer through EGFR/JAK1/STAT3 pathway to inhibit PD-1/PD-L1 checkpoint signaling[J]. *Phyto-medicine*, 2022, 99: 153939.
- [30] HUO R R, LIU H T, DENG Z J, et al. Dose-response between serum prealbumin and all-cause mortality after hepatectomy in patients with hepatocellular carcinoma[J]. *Front Oncol*, 2021, 10: 596691.
- [31] 李家群, 陈正义, 钟文洲, 等. 重症急性胰腺炎患者肠外营养相关性肝损伤的风险模型构建[J]. *中国急救医学*, 2023, 43(12): 954-960.
- LI J Q, CHEN Z Y, ZHONG W Z, et al. Risk model of parenteral nutrition-associated liver disease in the patients with severe acute pancreatitis[J]. *Chin J Crit Care Med*, 2023, 43(12): 954-960.
- [32] 陈昶舟, 赵海潮, 付西峰, 等. MiR-203-3p 在肝癌细胞中的表达及其对细胞增殖、迁移和侵袭的影响[J]. *现代肿瘤医学*, 2021, 29(18): 3133-3138.
- CHEN C Z, ZHAO H C, FU X F, et al. The expression of miR-203-3p in hepatocellular carcinoma cells and the effects of cell proliferation, migration and invasion[J]. *J Mod Oncol*, 2021, 29(18): 3133-3138.
- [33] 周阳, 尹星, 付民, 等. 乙肝相关肝癌患者血清中癌基因 C-myc、N-ras、PLK1、FGF2 蛋白水平对 TACE 术后预后的预测价值分析[J]. *国际检验医学杂志*, 2024, 45(3): 347-352, 357.
- ZHOU Y, YIN X, FU M, et al. Analysis of the predictive value of the protein level of oncogenes C-myc, N-ras, PLK 1, and FGF2 in the serum of hepatitis B-related liver cancer patients on the prognosis after TACE[J]. *Int J Lab Med*, 2024, 45(3): 347-352, 357.
- [34] WANG K, XIE M H, ZHU L, et al. Ciliary neurotrophic factor protects SH-SY5Y neuroblastoma cells against A β 1-42-induced neurotoxicity via activating the JAK2/STAT3 axis[J]. *Folia Neuropathol*, 2015, 53(3): 226-235.
- [35] CHEN H, CHEN Y J, WANG X, et al. Edaravone attenuates myocyte apoptosis through the JAK2/STAT3 pathway in acute myocardial infarction [J]. *Free Radic Res*, 2020, 54(5): 351-359.
- [36] TAN J K, MA X F, WANG G N, et al. LncRNA MIAT knock-down alleviates oxygen-glucose deprivation-induced cardiomyocyte injury by regulating JAK2/STAT3 pathway via miR-181a-5p [J]. *J Cardiol*, 2021, 78(6): 586-597.
- [37] PIPICZ M, DEMJAN V, SARKOZY M, et al. Effects of cardiovascular risk factors on cardiac STAT3[J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(11): 3572.
- [38] BALDINI C, MORICONI F R, GALIMBERTI S, et al. The JAK-STAT pathway: An emerging target for cardiovascular disease in rheumatoid arthritis and myeloproliferative neoplasms [J]. *Eur Heart J*, 2021, 42(42): 4389-4400.
- [39] 戴琦, 崔宁, 刘文静. 黄芩苷调节 JAK2/STAT3 信号通路对口腔鳞癌细胞增殖、凋亡和侵袭的影响[J]. *陕西医学杂志*, 2024, 53(2): 179-183.
- DAI Q, CUI N, LIU W Z. Impacts of baicalin on proliferation, apoptosis and invasion of oral squamous cell carcinoma cells by regulating JAK2/STAT3 signaling pathway[J]. *Shaanxi Med J*, 2024, 53(2): 179-183.
- [40] 凌静, 吴瑶, 田国平. 达格列净调控 JAK2/STAT3 轴对大鼠缺血性室性心律失常的作用[J]. *中国临床药理学杂志*, 2024, 40(3): 388-392.
- LING J, WU Y, TIAN G P. Effects of dapagliflozin on ischemic ventricular arrhythmia in rats by regulating JAK2/STAT3 axis [J]. *Chin J Clin Pharmacol*, 2024, 40(3): 388-392.

(编辑:董宇)