

基于网络药理学的参麦注射液治疗 新型冠状病毒感染合并心肌炎的机制研究

张艺文 蔡琳 秦莉 杨晓倩 汪汉

(西南交通大学医学院 西南交通大学附属医院 成都市第三人民医院心内科, 四川 成都 610031)

【摘要】目的 探讨参麦注射液治疗 2019 新型冠状病毒(2019-nCoV)感染合并心肌炎可能的作用靶点和机制。**方法** 采用网络药理学研究方法,首先通过中药系统药理学数据库与分析平台和中药整合药理学平台筛选参麦注射液中的主要活性成分及其作用靶点,通过 GeneCards 数据库和 OMIM 数据库筛选 2019 冠状病毒病(COVID-19)和心肌炎两种疾病的主要靶点,使用 R 语言筛选参麦注射液作用于 COVID-19 感染心肌炎的相关靶点(即交集基因),采用 Cytoscape3.6.0 软件构建“药物-成分-靶点-疾病”网络图,将得到的靶点再利用 String 数据库进行蛋白互作网络分析,并利用 R 语言对交集基因进行基因本体功能分析和京都基因与基因组百科全书通路分析。**结果** 经过筛选得到 17 个参麦注射液作用于 2019-nCoV 感染心肌炎的相关靶点,基因本体功能分析得到 42 个具有统计学意义($P < 0.05$)的生物学过程,以及京都基因与基因组百科全书通路得到 154 条信号通路。**结论** 本研究探讨了参麦注射液治疗 2019-nCoV 感染心肌炎的有效成分,预测其主要是通过 B 淋巴细胞瘤-2 基因、丝裂原活化蛋白激酶 3、白介素-6 潜在靶点,调控肿瘤坏死因子、白介素-17 信号通路来调节免疫功能,揭示了多层次、多靶点和多途径的作用机制,为临床应用及进一步探究其作用机制奠定了基础。

【关键词】 参麦注射液;2019 新型冠状病毒;心肌炎;网络药理学;作用机制

【DOI】10.16806/j.cnki.issn.1004-3934.2020.10.024

Shenmai Injection for COVID-19 with Myocarditis Based on Network Pharmacology

ZHANG Yiwen, CAI Lin, QIN Li, YANG Xiaoqian, WANG Han

(Department of Cardiology, The Third People's Hospital of Chengdu, The Affiliated Hospital of Southwest Jiaotong University, Southwest Jiaotong University Medical School, Chengdu 610031, Sichuan, China)

【Abstract】Objective To explore the possible targets and mechanism of shenmai injection for COVID-19 and myocarditis. **Methods** By using network pharmacology, the main active components and target genes of shenmai injection were screened by TCMSP and TCMIP platform. The main target genes for COVID-19 and myocarditis were screened by GeneCards database and OMIM database. R software was used to predict the key targets of shenmai injection intervention on COVID-19 and myocarditis. Cytoscape3.6.0 software was used to construct a “drug-components-targets-diseases” network map. The obtained target genes were analyzed by the String database for protein interaction network analysis, and the R software was used to analyze the GO function and KEGG pathway of the intersection genes. **Results** 17 targets of shenmai injection in treatment of COVID-19 and myocarditis were screened. The GO analysis revealed 42 statistically significant ($P < 0.05$) biological processes, KEGG analysis yielded 154 signal pathways. **Conclusion** This study explored the effective components of shenmai injection for COVID-19 and myocarditis, and predicted that it mainly regulates immune function through potential targets such as BCL2, MAPK3, IL-6, and other potential targets, and regulate signal pathways such as TNF and IL-17, revealing the multi-level, multi-target and multi-channel mechanism of shenmai injection. This study laid a foundation for clinical application and further exploration of its mechanism.

【Key words】 Shenmai injection; 2019-nCoV; Myocarditis; Network pharmacology; Mechanism

自 2019 年 12 月起,湖北省武汉市陆续出现了多例新型冠状病毒(2019-nCoV)感染的肺炎患者。随着疫情的不断发展,中国其他省份以及国外部分国家也

相继出现此类病例。2019 冠状病毒病(COVID-19)具有极强的传染性,严重危害人民的生活质量和社会的稳定。目前尚未出现 COVID-19 的特异性治疗方法,

西医主要以对症支持治疗为主,随着疾病认识的深入和诊疗经验的积累,2020 年 2 月 19 日,国家卫生健康委员会发布了《新型冠状病毒肺炎诊疗方案(试行第六版)》。与之前的方案相比,此方案中增加了 4 种中药注射液,包括热毒宁注射液、醒脑静注射液、痰热清注射液和参麦注射液,适用于重型、危重型的肺炎患者^[1]。相关临床研究表明,参麦注射液治疗病毒性心肌炎的疗效显著,可以提高机体免疫功能,降低炎症反应及氧化应激损伤^[2-3]。参麦注射液的主要成份是红参和麦冬,麦冬可养阴生津,红参具有益气固脱的功效,二者协同可益气养阴^[4]。

网络药理学是利用系统生物学和计算机技术,构建“疾病-基因-靶点-药物”相互作用网络,了解相关通路网络存在的潜在机制,解释药物作用于人体的奥秘。本文利用网络药理学的方法,筛选出参麦注射液的成分群,运用中药系统药理数据库和分析平台(TCMSP)、GeneCards 数据库(GeneCards, <https://www.genecards.org>)、在线人类孟德尔遗传数据库(OMIM)收集参麦注射液治疗 2019-nCoV 感染合并心肌炎的相关靶点,构建“药物-药物活性成分-靶点-疾病”网络图、靶标蛋白相互作用以及相关生物通路,为参麦注射液治疗 2019-nCoV 感染合并心肌炎的作用机制提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 参麦注射液的主要化学成分和靶点的收集

参麦注射液由红参和麦冬两味中药提炼而成。利用 TCMSP,并结合中药整合药理学平台(TCMIP)对参麦注射液中红参和麦冬的主要化学成分以及相应靶点进行查询及筛选,以口服生物利用度 $\geq 30\%$,类药性 ≥ 0.18 作为药物化学性成分筛选条件。将查询到的靶点剔除掉非人源和不规范的靶点后,在 Uniprot 数据库中校正为官方基因名缩写。

1.2 COVID-19 和心肌炎相关基因的筛选

将“myocarditis”“myocardium”作为检索词,分别通过 GeneCards、OMIM 数据库检索心肌炎的相关靶点,删除重复靶点基因,建立心肌炎靶点数据库。同样,将“novel coronavirus”作为检索词,通过 GeneCards、OMIM 数据库检索 COVID-19 相关靶点,删除重复靶点基因,建立 COVID-19 靶点数据库。

1.3 参麦注射液对 COVID-19 合并心肌炎作用靶点的预测及蛋白互作网络构建

首先将所预测到的参麦注射液的作用靶点与筛选出的 COVID-19 和心肌炎的相关靶点导入 R 语言中,通过“VennDiagram”安装包绘制出相关的 Venn 图,并得到药物与疾病间的共同靶点,即为参麦注射液作用

于 COVID-19 合并心肌炎的靶点。利用 Cytoscape3.6.0 软件绘制“药物-活性成分-靶点-疾病”网络图,再将药物与疾病的共同靶点上传至 STRING11.0 数据库中,选择研究物种为“Homo sapiens”,获得各靶点间的联系网络图。

1.4 基因本体功能分析和京都基因与基因组百科全书通路富集分析

通过 R 语言利用“clusterProfiler”安装包对参麦注射液作用于 COVID-19 合并心肌炎的靶点进行基因本体(gene ontology, GO)功能分析和京都基因与基因组百科全书(Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)通路富集分析,筛选具有显著差异($P < 0.05$)的生物过程及可靠的靶点通路。

2 结果

2.1 参麦注射液的主要活性成分和相关靶点

从 TCMSP 数据库和 TCMIP 数据库中搜索红参、麦冬两种中药的活性成分以及相关靶点,以口服生物利用度 $\geq 30\%$ 和类药性 ≥ 0.18 作为筛选条件,剔除重复以及未找到对应靶点的化合物,得到 56 个化合物。利用 Uniprot 数据库对靶点名称转化为标准的基因名缩写,剔除重复非人源以及无标准基因名的靶点,最终得到 38 个有效活性成分和 412 个靶标基因。

2.2 疾病相关基因

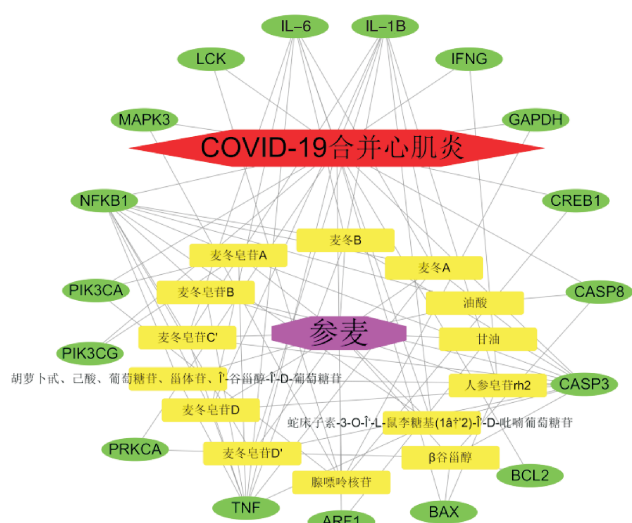
通过 GeneCards 和 OMIM 数据库检索到与 COVID-19 相关基因共有 348 个,同与心肌炎相关的基因共有 1 010 个,剔除重复基因后,心肌炎相关基因有 987 个。

2.3 预测参麦注射液作用于 2019-nCoV 感染心肌炎潜在靶点

利用 R 语言找到参麦注射液可能的作用靶点与疾病靶点之间的交集基因,得到 17 个交集基因,分别是 BCL2、BAX、CASP3、CASP8、PRKCA、IL-1B、IFNG、TNF、IL-6、MAPK3、PIK3CA、NFKB1、CREB1、PIK3CG、GAPDH、ARF1 和 LCK。

2.4 构建“药物-活性成分-靶点-疾病”网络图

将预测到的 17 个共有靶点基因以及药物的活性成分导入 Cytoscape3.6.0 软件中,构建参麦注射液治疗 2019-nCoV 感染心肌炎的化合物-靶点相互作用的网络图,见图 1。该网络中包含 33 个节点和 89 条边线,不同颜色的节点分别代表药物、药物活性成分、靶点以及相关疾病,边线表示各节点之间的相互作用关系。通过分析所构建的网络图,可初步了解参麦注射液的有效成分通过作用于哪些疾病靶点发挥功效的。

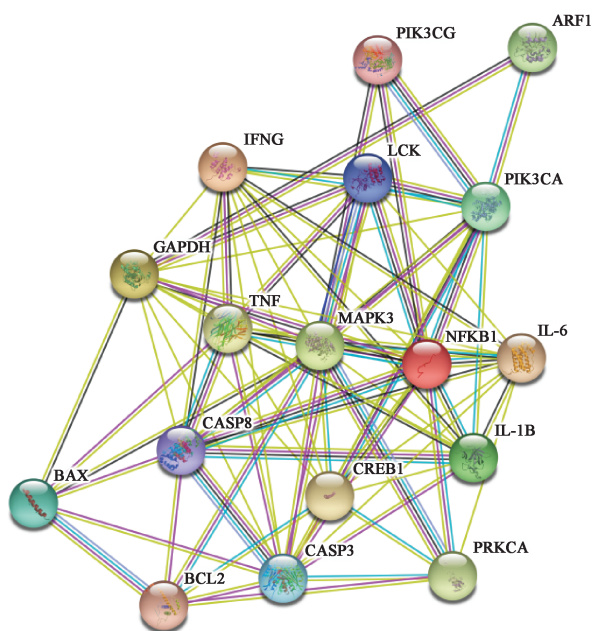


注:八边形节点:参麦注射液;六边形:COVID-19 和心肌炎;长方形节点:参麦注射液的有效活性成分;椭圆形节点:参麦注射液—COVID-19 和心肌炎的共同靶点。

图1 “药物-疾病-活性成分-靶点”网络图

2.5 关键靶点的蛋白互作网络构建以及核心基因

在 STRING 数据库中导入参麦作用于疾病的 17 个靶点基因,获取蛋白相互作用的网络图,如图 2 所示。图中含有 17 个靶蛋白和 81 条互作边,其中边代表作用靶点之间的关联,节点代表作用靶点。将各靶点所连接的节点数目进行排序,做出如图 3 的柱状图,其中连接节点最多的是 MAPK3 基因,能与其余 15 个靶点蛋白产生作用。



注:节点:靶点蛋白;不同颜色的连线代表不同的互作关系的证据。

图2 参麦治疗 COVID-19 和心肌炎共同靶点的蛋白互作网络图

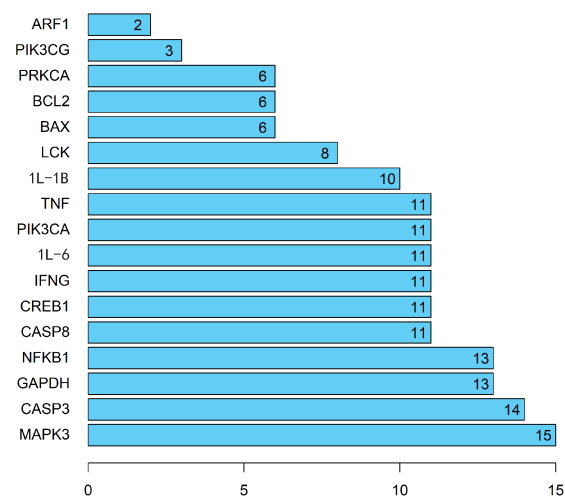


图3 关键靶点

2.6 靶点的 GO 功能富集分析和 KEGG 通路富集分析

利用 R 语言对参麦作用于 2019-nCoV 感染心肌炎的靶点进行 GO 和 KEGG 富集分析。GO 富集分析发现 42 个具有统计学意义 ($P < 0.05$) 的生物过程,主要包括细胞因子受体结合、肿瘤坏死因子受体超家族结合、细胞因子活性、1-磷脂酰肌醇-3-激酶活性、BH 结构域结合等,其中细胞因子受体结合涉及到的基因有 TNF、IL-6、CASP3、CASP8、IL-1B 和 IFNG。富集结果按照 P 值由小到大进行排序, P 值越小富集结果越显著,见图 4。

KEGG 通路富集分析得到 154 条信号通路 ($P < 0.05$),将结果的前 20 条通路做出气泡图,如图 5 所示。其共同靶点主要富集于乙型肝炎、甲型流感、结核病等疾病以及糖尿病并发症中 AGE-RAGE、TNF 和 IL-17 等相关信号通路上。

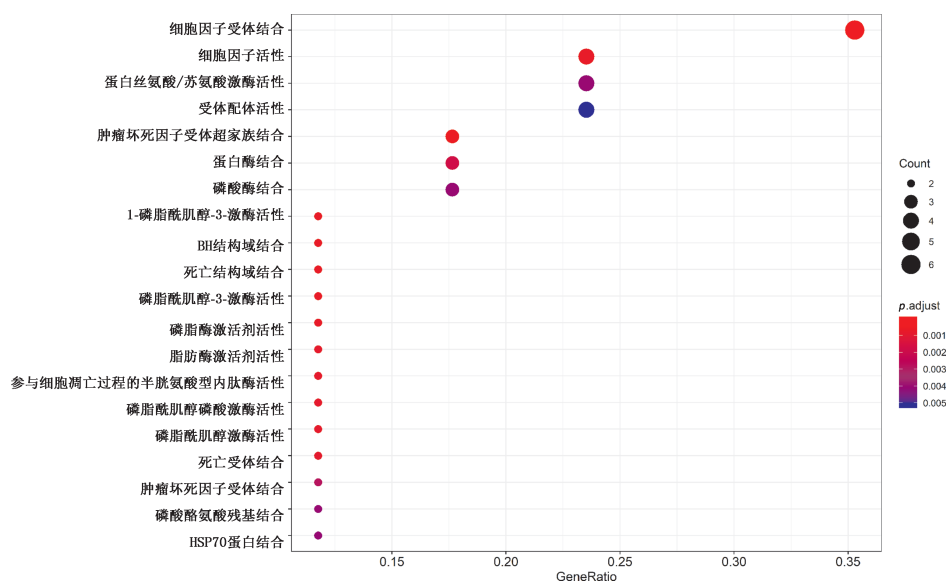
3 讨论

此次 2019-nCoV 引起的肺炎疫情形势严峻,部分患者由于 2019-nCoV 感染出现心肌炎,加重患者心肺功能损害,增加死亡风险。目前尚未找到针对 COVID-19 的特效药物,西医主要的治疗方式是抗病毒和对症支持治疗,而中医治疗讲究整体观,注重调节机体平衡,提高自身免疫力去对抗“疫”病。在《新型冠状病毒肺炎诊疗方案(试行第六版)》中增加了治疗重型和危重型患者的中成药注射液。参麦注射液是由红参和麦冬组成的中药复方注射液,具有抗炎、抗缺血再灌注损伤、抗休克和增强免疫功能等作用^[1]。

本研究通过中药复方网络药理学的方法筛选到 14 种中药活性成分,包括 β -谷甾醇、人参皂苷 rh2、齐墩果酸以及麦冬素系列等。通过对药物的 14 种活性成分的靶基因以及 COVID-19 和心肌炎的靶基因进行

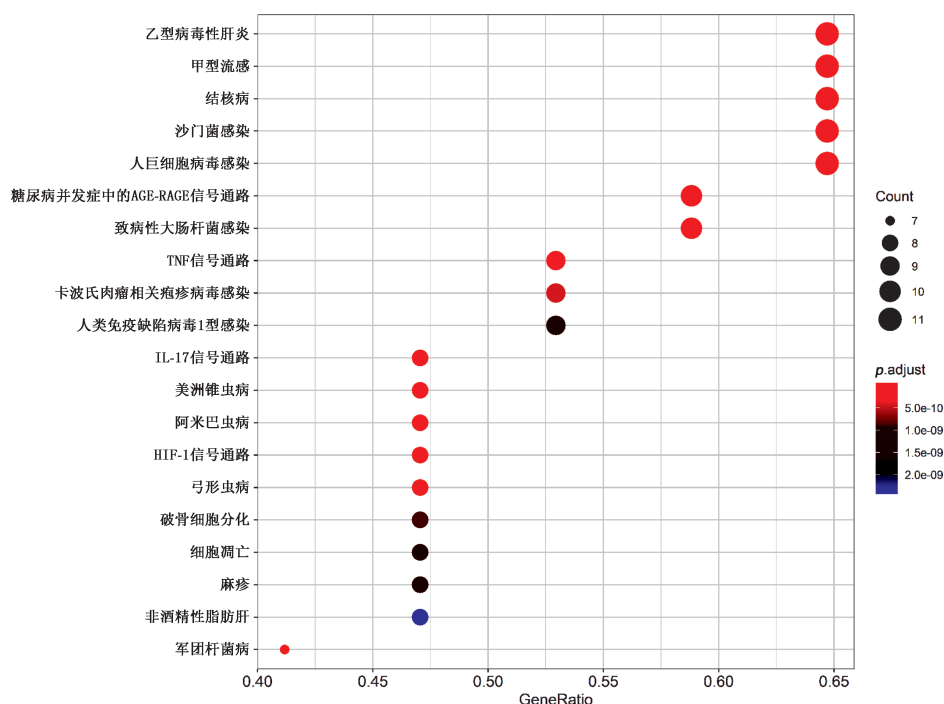
筛选并取交集,得到参麦作用于 2019-nCoV 感染心肌炎的 17 个相关靶点,包括 BCL2、BAX、CASP3、CASP8、PRKCA、IL-1B、IFNG、TNF、IL-6、MAPK3、PIK3CA、NFKB1、CREB1、PIK3CG、GAPDH、ARF1 和 LCK。这些靶点参与细胞凋亡、细胞增殖分化、心肌肥大以及免疫炎症反应的调节。通过 GO 富集分析发现主要涉及的生物学功能有细胞因子受体结合、肿瘤坏死因子受体超家族结合、细胞因子活性、1-磷脂酰肌醇-3-激酶活

性、BH 结构域结合等 42 个,表明参麦注射液主要是通过调节免疫炎症反应,参与细胞增殖分化以及凋亡的过程来治疗 2019-nCoV 感染的心肌炎。KEGG 通路分析显示这些靶点是富集于乙型肝炎、甲型流感、结核病等疾病以及糖尿病并发症中 AGE-RAGE、TNF 和 IL-17 等相关信号通路发挥作用。由此可见,参麦注射液是通过多成分、多靶点、多通路治疗 2019-nCoV 感染的心肌炎。



注:节点的大小越大,表明富集在该生物学过程上的基因越多;节点的颜色越红,表明 P 值越小。

图4 参麦治疗 COVID-19 和心肌炎的主要生物学过程(前 20 个)



注:节点的大小越大,表明富集在该通路上的基因越多;节点的颜色越红,表明 P 值越小。

图5 参麦治疗 COVID-19 和心肌炎的主要信号通路(前 20 条)

BCL2 蛋白家族是控制细胞凋亡的一个关键点,该家族由三个亚类组成: BH3——唯一对凋亡作出反应的启动子,防止细胞死亡的抗凋亡卫士,以及膜渗透效应因子 BAX、BAK 和 BOK^[5]。CASP3 和 CASP8 都是与细胞凋亡相关的蛋白酶^[6]。MAPK3 是丝氨酸-苏氨酸蛋白激酶, PRKCA 是丝氨酸-苏氨酸特异性蛋白激酶 C 家族成员,二者均参与细胞增殖、凋亡、分化以及炎症的调节^[7-8]。IL-1B 是 IL-1 家族中经典的促炎细胞因子^[9],炎症急性期由活化的巨噬细胞产生,造成局部或全身性反应,已被证明是治疗炎症性疾病的有效靶点。IL-6 是一种多功能细胞因子,参与免疫反应相关细胞的增殖分化以及功能调节^[10]。同样,IFNG 在病原体侵入宿主时激活巨噬细胞作出免疫应答,并且在多个水平上调免疫反应^[11]。NFKB1 和 CREB1 都参与转录的过程, NFKB1 在调节对感染作出的免疫应答中起关键作用,有研究发现 NFKB1 在 NK 细胞的成熟和效应功能中发挥重要作用^[12]。PIK3CA 和 PIK3CG 参与细胞内的信号转导,这些信号与细胞增殖凋亡相关^[13]。LCK 基因(淋巴细胞特异性蛋白酪氨酸激酶)是调节 T 细胞功能的关键分子之一, LCK 可以通过调控 TCR 信号传导, T 细胞发育以及稳态的启动来调节免疫炎症反应^[14]。因此,可推测参麦注射液通过抑制 IL-1B、IL-6 等关键炎症细胞因子和受体的表达,有效降低多种促炎信号通路的活性,具有调节免疫应答和减轻炎症反应的作用。

从 GO 富集分析的结果可知,这些靶点的功能主要与免疫炎症反应和细胞凋亡有关。KEGG 富集分析的结果显示,参麦注射液治疗的过程主要涉及 TNF 通路、IL-17 信号通路以及凋亡等, TNF 通路是主要的细胞凋亡信号通路之一^[15], IL-17 信号通路是炎症反应中起重要作用的通路^[16]。因此可以推测参麦注射液是通过上述的生物学功能以及相关的信号通路达到治疗作用。

综上所述,本研究利用网络药理学的方法对参麦注射液治疗 2019-nCoV 感染心肌炎的作用机制进行了探索性的研究,揭示了参麦注射液治疗 2019-nCoV 感染心肌炎有效成分、作用靶点以及相关机制。由于通过数据库提供的信息有限,因此预测靶点具有一定局

限性,这些靶点以及途径还需要基础实验的验证。

参考文献

- [1] 熊微,冉京燕,谢雪佳,等. 治疗新型冠状病毒肺炎中成药的药理作用与临床应用[J]. 医药导报,2020,39(4):465-476.
- [2] Zhang S, You ZQ, Yang L, et al. Protective effect of Shenmai injection on doxorubicin-induced cardiotoxicity via regulation of inflammatory mediators[J]. BMC Complement Altern Med,2019,19(1):317.
- [3] 庞越. 参麦注射液治疗病毒性心肌炎的 Meta 分析[J]. 中国医药指南,2015,13(8):200-201.
- [4] 万一,高玉英,张文. 参麦注射液对病毒性心肌炎患者的疗效及外周血 NLRP3 炎性小体的影响[J]. 湖南中医药大学学报,2020,40(1):100-104.
- [5] Moldoveanu T, Czabotar PE. BAX, BAK, and BOK: a coming of age for the BCL-2 family effector proteins[J]. Cold Spring Harb Perspect Biol,2020,12(4):a036319.
- [6] Ghanekar Y, Sadasivam S. In silico analysis reveals a shared immune signature in CASP8-mutated carcinomas with varying correlations to prognosis[J]. Peer J,2019,7:e6402.
- [7] di Paola R, Crisafulli C, Mazzone E, et al. Effect of PD98059, a selective MAPK3/MAPK1 inhibitor, on acute lung injury in mice[J]. Int J Immunopathol Pharmacol,2009,22(4):937-950.
- [8] Hernandez R, Garcia F, Encio I, et al. Promoter analysis of the human p44 mitogen-activated protein kinase gene (MAPK3): transcriptional repression under nonproliferating conditions[J]. Genomics,2004,84(1):222-226.
- [9] 武亚琳,梁斌,杨志明. NLRP3/IL-1 β 途径的促动脉粥样硬化作用及临床应用[J]. 心血管病学进展,2019,40(6):943-946.
- [10] Poffenberger MC, Horwitz MS. IL-6 during viral-induced chronic autoimmune myocarditis[J]. Ann N Y Acad Sci,2009,1173:318-325.
- [11] Wu S, Liu X, Wang Y, et al. Genetic polymorphisms of IFNG and IFNGR1 with latent tuberculosis infection[J]. Dis Markers,2019,2019:8410290.
- [12] Lougaris V, Patrizi O, Baronio M, et al. NFKB1 regulates human NK cell maturation and effector functions[J]. Clin Immunol,2017,175:99-108.
- [13] Yang X, Li X, Lin Q, et al. Up-regulation of microRNA-203 inhibits myocardial fibrosis and oxidative stress in mice with diabetic cardiomyopathy through the inhibition of PI3K/Akt signaling pathway via PIK3CA[J]. Gene,2019,715:143995.
- [14] Bommhardt U, Schraven B, Simeoni L. Beyond TCR signaling: emerging functions of Lck in cancer and immunotherapy[J]. Int J Mol Sci,2019,20(14):3500.
- [15] Shu Y, Yang Y, Zhao Y, et al. Melittin inducing the apoptosis of renal tubule epithelial cells through upregulation of Bax/Bcl-2 expression and activation of TNF- α signaling pathway[J]. Biomed Res Int,2019,2019:9450368.
- [16] Wu Z, Ding L, Bao J, et al. Co-infection of mycoplasma gallisepticum and escherichia coli triggers inflammatory injury involving the IL-17 signaling pathway[J]. Front Microbiol,2019,10:2615.

收稿日期:2020-03-12