

基于网络药理学的血必清注射液治疗新型冠状病毒感染合并心肌炎的作用机制研究

唐超 蔡琳 张艺文 汪汉

(西南交通大学附属医院 成都市第三人民医院心内科 成都市心血管病研究所, 四川 成都 610031)

【摘要】目的 基于网络药理学探索血必清注射液作用于新型冠状病毒感染合并心肌炎的主要活性成分及作用机制。**方法** 利用 TCMSP 数据库对血必清注射液的主要活性成分及其靶点筛选,再运用 GeneCards 数据库和 OMIM 数据库筛选新型冠状病毒感染合并心肌炎的相关靶点,最后对药物靶点和疾病靶点进行 Venn 分析,得到血必清注射液作用于新型冠状病毒感染合并心肌炎的交集靶点。利用 STRING 数据库对交集靶点进行蛋白互作网络分析并筛选关键靶点。采用 Cytoscape 3.6.1 软件构建“药物-活性成分-靶点-疾病”网络图,对靶点基因进行基因本体富集分析和京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路分析。**结果** 经筛选得到血必清注射液作用于新型冠状病毒感染合并心肌炎的活性成分 125 个和作用靶点 41 个,主要涉及 71 个生物学过程和 135 条通路。**结论** 本研究初步验证血必清注射液可通过多成分、多靶点和多通路来发挥治疗新型冠状病毒感染合并心肌炎的作用。

【关键词】 血必清注射液;新型冠状病毒感染合并心肌炎;网络药理学;作用机制

【DOI】10.16806/j.cnki.issn.1004-3934.2021.01.021

Mechanisms and Active Ingredients of Xuebiqing Injection Affecting Novel Coronavirus Infection Complicated with Myocarditis Based on Network Pharmacology

TANG Chao, CAI Lin, ZHANG Yiwen, WANG Han

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

【Abstract】Objective To explore the main active ingredients and mechanisms of Xuebiqing injection on novel coronavirus infection complicated with myocarditis based on network pharmacology. **Methods** The main active ingredients with their targets of Xuebiqing injection were screened by TCMSP database, and the targets of novel coronavirus infection complicated with myocarditis were screened by GeneCards database and OMIM database. The intersection targets of the medicine and disease were obtained by Venn analysis. We use STRING database to clarify the protein interaction network from intersection targets and screen for the key targets. The network map of “drug-active ingredient-target-disease” was constructed by Cytoscape 3.6.1 software, and the target genes were analyzed by GO enrichment analysis and KEGG pathway analysis. **Results** We found 125 active ingredients and 41 targets related to Xuebiqing injection as treatment for novel coronavirus infection with myocarditis, which mainly involved 71 biological processes and 135 signaling pathways. **Conclusion** This study preliminarily verified that Xuebiqing injection can play a role in the treatment of novel coronavirus infection complicated with myocarditis through multiple active ingredients, targets and pathways.

【Key words】 Xuebiqing injection; Novel coronavirus infection complicated with myocarditis; Network pharmacology; Mechanism

2019 年底开始,新型冠状病毒肺炎从湖北武汉迅速传播到中国各省及全球,严重危害到了人类健康。本次由 2019 新型冠状病毒(2019-nCoV)引发的疾病被世界卫生组织命名为 2019 冠状病毒病(corona virus disease 2019, COVID-19)。2019-nCoV 与引起严重急性呼吸综合征(severe acute respiratory syndrome, SARS)和中东呼吸综合征(Middle East respiratory syndrome,

MERS)的冠状病毒关系密切,同为 β 属冠状病毒,并且具有相同的血管紧张素转换酶 2(angiotensin-converting enzyme 2, ACE2)受体^[1]。COVID-19 在流行病学上表现为潜伏期长、传染性强和人群普遍易感的特点,从中医观点看,归于“疫病”范畴。患者感染 2019-nCoV 后不仅有发热、乏力和干咳等典型的临床表现,还有与病毒感染相关的心脏受损的症状,其中,心肌炎是 COVID-19 患

者心脏受损的重要表现之一^[2],其可能的发病机制为全身炎症反应。而血必清注射液具有补脾益气和清热解毒的功效,临床上用于治疗因呼吸系统疾病和泌尿系统疾病等感染引起的全身炎症反应综合征,对因感染、创伤和烧伤等引起的多器官功能障碍综合征(瘀毒互结和热毒内陷证)患者的器官功能受损期和衰竭早期也有一定作用,推测血必清注射液可能是 2019-nCoV 感染合并心肌炎的一种潜在治疗药物^[3]。

血必清注射液是红花、赤芍、川芎、丹参和当归等中药材提取物,主要成分为红花黄色素 A 等,用于温热类疾病,症见发热、喘促、心悸和烦躁等瘀毒互结证,适用于因感染诱发的全身炎症反应综合征,也可配合治疗多器官功能失常综合征的脏器功能受损,但其作用机制尚不明确^[4]。在治疗 2019-nCoV 感染的处方中,血必清注射液是新冠 2 号和新冠 3 号的推荐中成药^[5]。因中药所含有效成分复杂,仅通过实验对其作用机制进行全面研究较为困难,而网络药理学则融合了药理学、系统生物学、计算机生物学及网络分析等多学科的技术和内容,通过构建“药物-活性成分-靶标-疾病”多层网络来分析药物作用于疾病的机制。本研究基于网络药理学方法,对血必清注射液作用于 2019-nCoV 感染合并心肌炎的作用机制进行系统分析,为血必清注射液的临床应用提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

中药系统药理学数据库和分析平台(TCMSP)(<http://tcmssp.com/tcmssp.php>),UniProt 数据库(UniProt,<https://www.uniprot.org/>),GeneCards 数据库(GeneCards,<https://www.genecards.org>),OMIM 数据库(OMIM,<https://www.omim.org>),Cytoscape 3.6.1 软件(Cytoscape,<https://cytoscape.org>),STRING 数据库(String,<https://string-db.org/>)和 R 3.6.2 软件(R,<https://www.r-project.org>)。

1.2 药物活性成分及靶点

TCMSP 可提供中药主要成分、靶点和疾病的信息,口服生物利用度(oral bioavailability,OB)和类药性(drug likeness,DL)是筛选药物主要成分常用的参数。借助 TCMSP 数据库分别检索血必清注射液的主要组成成分:红花、赤芍、川芎、丹参和当归,筛选出 OB \geq 30% 和 DL \geq 0.18 的化合物作为血必清注射液的主要成分,并根据 TCMSP 数据库中的“related targets”功能,筛选出与其化合物相对应的靶点。此外,利用 UniProt 数据库把靶点蛋白名称统一转化为基因名称,删除部分不规范的靶点。

1.3 疾病靶点的预测

GeneCards 数据库收录了较全面的人类基因信息,包括基因组学、转录组学、蛋白质组学和遗传学等。OMIM 数据库主要对人类基因和表型及其之间的关系进行了全面描述。在 GeneCards 数据库和 OMIM 数据库中分别检索 2019-nCoV 和心肌炎,然后把两个数据库的检索内容合并取交集,交集所得结果即 2019-nCoV 感染合并心肌炎的相关靶点。

1.4 血必清注射液作用于 2019-nCoV 感染合并心肌炎的靶点预测

药物和疾病的共同靶点即药物作用于疾病的潜在靶点。通过使用 R 软件中的“VennDiagram”安装包对血必清注射液和 2019-nCoV 感染合并心肌炎的靶点取交集,两者的共同靶点即血必清注射液作用于 2019-nCoV 感染合并心肌炎的相关靶点。

1.5 可视化网络构建及关键靶点筛选

蛋白互作网络和“药物-活性成分-靶点-疾病”网络能更明确地显示药物和疾病之间复杂的相互关系。药物的活性成分可直接或间接作用于疾病靶点从而发挥治疗作用,而疾病的形成和治疗与其靶点也有着直接或间接的关系。血必清注射液作用于 2019-nCoV 感染合并心肌炎的相关靶点输入 STRING 数据库来构建蛋白互作网络,物种设置为“人”(“Homo sapiens”)。根据靶点蛋白相互作用连线数目进行排序,连线数目越大表示该靶点蛋白在药物治疗疾病过程中所起作用越大,选用蛋白互作网络中连线数目最多的 30 个靶点蛋白作为关键靶点。利用 Cytoscape 软件构建“药物-活性成分-靶点-疾病”网络。网络主要包括药物、药物活性成分、疾病及其靶点四类节点,两节点之间均以边相连。

1.6 基因本体及通路富集分析

基因本体(gene ontology,GO)富集分析常用于注释基因及其基因产物的功能,包括分子功能、生物过程和细胞组分三个生物学范畴。京都基因与基因组百科全书(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes,KEGG)可对靶点进行通路富集分析,有利于探索药物治疗疾病的作用机制。利用 R 软件的“clusterProfiler”“DOSE”和“pathview”安装包对血必清注射液治疗 2019-nCoV 感染合并心肌炎的靶基因进行 GO 富集分析和 KEGG 通路富集分析,并以 $P < 0.05$ 作为筛选条件,将前 20 条富集显著的结果进行图表可视化。

2 结果

2.1 血必清注射液的活性成分及靶点

利用 TCMSP 数据库分别检索血必清注射液的主

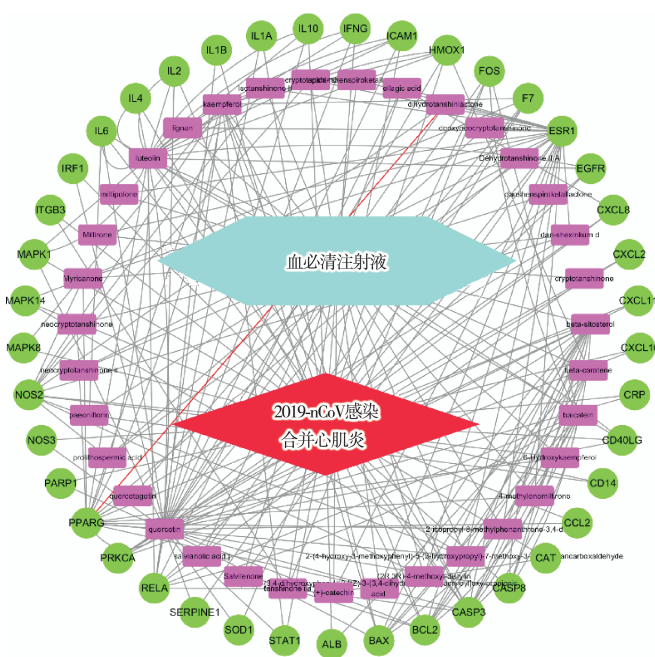
要组成成分:红花、赤芍、川芎、丹参和当归,以 $OB \geq 30\%$ 和 $DL \geq 0.18$ 为筛选条件,删除无相对应靶点的化合物、重复或无相对应基因名称的靶点蛋白,最终获得 125 个符合条件的有效成分(红花 22 个,赤芍 29 个,川芎 7 个,丹参 65 个,当归 2 个),其对应 6 933 个相关靶点(红花 1 466 个,赤芍 681 个,川芎 1 356 个,丹参 2 566 个,当归 864 个),共 215 个靶基因。

2.2 2019-nCoV 感染合并心肌炎的靶点

利用 GeneCards 数据库和 OMIM 数据库分别检索 COVID-19 和心肌炎,并把两个数据库的检索结果合并,获得 COVID-19 相关基因 359 个,心肌炎相关基因 1 062 个,然后把以上两种疾病的相关基因取交集,最终获得 2019-nCoV 感染合并心肌炎的靶基因 177 个。

2.3 血必清注射液作用于 2019-nCoV 感染合并心肌炎的相关靶点及“药物-活性成分-靶点-疾病”网络构建

对 215 个血必清注射液的靶基因和 177 个 2019-nCoV 感染合并心肌炎的相关基因进行 Venn 分析,获得 41 个疾病和药物的共同基因,即为血必清注射液作用于 2019-nCoV 感染合并心肌炎的潜在靶点,其对应血必清注射液化合物 71 个。将疾病、药物以及筛选得到的药物活性成分、疾病和药物的共同靶点导入 Cytoscape 软件进行“药物-活性成分-靶点-疾病”网络的构建,见图 1。网络中共有 78 个节点(35 个化合物、41 个靶点、1 个疾病和 1 个药物),235 条边,不同形状(或不同颜色)的节点分别代表药物、药物活性成分、靶点和疾病。



注:长方形节点:血必清注射液活性成分;圆形节点:疾病-药物的共同靶点。

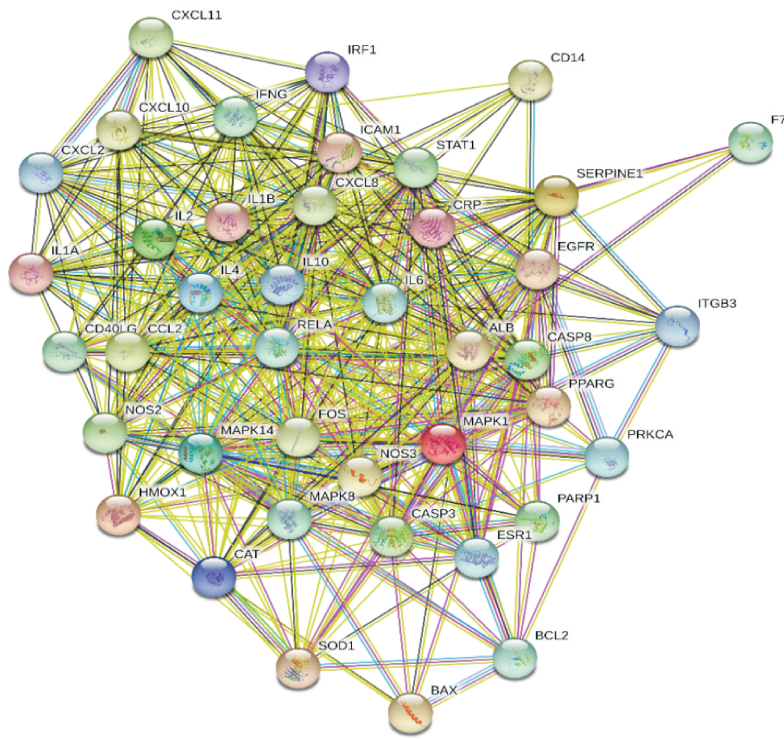
图 1 药物-活性成分-靶点-疾病网络图

2.4 蛋白互作网络的构建及关键靶点筛选

通过将疾病和药物的共同靶点导入 STRING 数据库,设定物种为人,并隐藏蛋白互作得分 < 0.4 的边,构建蛋白互作网络,发现网络中有 41 个相互作用节点,496 个边,结果见图 2。网络中各节点代表不同的靶点蛋白,不同颜色的边代表不同的相互作用类型,靶点蛋白间相互作用连线的数目与该靶点在药物治疗疾病过程中所起作用相关。按照相互作用连线的数目大小进行排序,选用连线数目最多的 30 个靶点蛋白作为关键靶点,包括白介素(IL)-6、IL-10、白蛋白(ALB)、C-X-C 基序趋化因子 8(CXCL8)、IL-1 β 、丝裂原活化蛋白激酶 8(MAPK8)、胱天蛋白酶 3(CASP3)、趋化因子 2(CCL2)、细胞间黏附分子-1(ICAM-1)、 γ 干扰素(IFN- γ)、IL-4、丝裂原活化蛋白激酶 1(MAPK1)、胱天蛋白酶 8(CASP8)、丝裂原活化蛋白激酶 14(MAPK14)、转录因子(RELA)、原癌基因(FOS)、IL-2、过氧化氢酶(CAT)、表皮生长因子受体(EGFR)、信号转导与转录因子 1- α/β (STAT1)、血红素加氧酶 1(HMOX1)、诱导型一氧化氮合酶(NOS2)、C-X-C 基序趋化因子 10(CXCL10)、过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (PPARG)、纤溶酶原激活物抑制物 1(SERPINE1)、内皮型一氧化氮合酶(NOS3)、C 反应蛋白(CRP)、雌激素受体 1(ESR1)、CD40 配体(CD40LG)和干扰素调节因子 1(IRF1),并将上述靶点蛋白做出柱状图,见图 3。

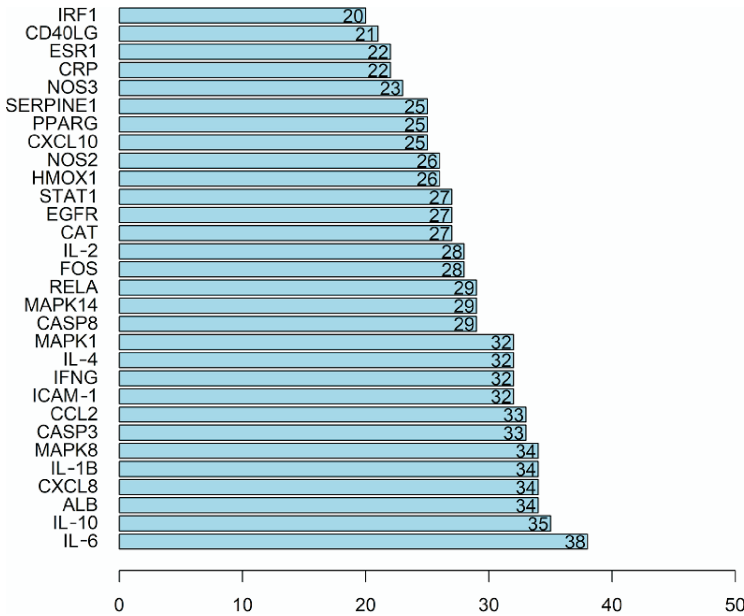
2.5 GO 及 KEGG 富集分析

利用 R 软件对血必清注射液治疗 2019-nCoV 感染合并心肌炎的相关基因进行 GO 富集分析和 KEGG 通路富集分析,两者均以 $P < 0.05$ 作为筛选条件, P 值越小富集越显著,在其功能或通路上的基因越多。在 GO 富集分析中含有 71 个生物学过程,根据 P 值大小进行排序,选取富集前 20 位的生物学过程,见表 1。表 1 显示,血必清注射液作用于 2019-nCoV 感染合并心肌炎,主要涉及细胞因子受体结合、细胞因子活性、受体配体活性、磷酸酶结合和趋化因子受体结合等多种生物学过程。KEGG 富集通路发现,41 个疾病-药物共同靶点显著富集在 135 条通路上,其中前 20 条富集显著通路的具体信息见图 4。纵轴为通路名称,横轴为基因比值。基因比值的大小表示富集程度的高低,点的大小表示富集的靶点基因数量,点的颜色从红色到蓝色表示 P 值从小到大。血必清注射液在治疗 2019-nCoV 感染合并心肌炎中主要通过糖尿病并发症相关的 AGE-RAGE 信号通路、IL-17 信号通路、Chagas 病和甲型流感等疾病相关通路发挥作用。



注：节点：靶点蛋白；不同颜色的边：不同的相互作用类型。

图 2 血必清注射液治疗 2019-nCoV 感染合并心肌炎 的蛋白互作网络图



注：横坐标：相互作用连线的数目；纵坐标：靶点蛋白。

图 3 血必清注射液作用于 2019-nCoV 感染合并心肌炎 的关键靶点

3 讨论

随着计算机信息学的迅速发展,网络药理学为研究中药的多成分及复杂的作用机制提供了新的研究方法。网络药理学从整体考虑药物与疾病的相关性,强调药物、靶点与疾病间相互作用的系统性,反映中成药的多成分、多靶点和多通路的作用特点^[6]。因此,本

研究首先使用 TCMSP 数据库对血必清注射液的中药活性成分进行筛选;运用 GeneCards 数据库和 OMIM 数据库对疾病靶点进行预测筛选,构建活性成分靶点网络图。将得到的靶点利用 STRING 进行蛋白互作网络构建,并进行 GO 和 KEGG 富集分析,构建靶点信号通路网络图,从而发现血必清注射液主要的活性成分、

主要作用的靶点和调节的通路。具体发现有:血必清注射液 5 个最主要的中药活性成分为:红花、赤芍、川芎、丹参和当归。研究结果显示血必清注射液与 2019-nCoV 感染合并心肌炎的交集靶点共有 41 个,其对应血必清注射液的活性成分主要包括槲皮素、木犀草素、 β -谷甾醇、山奈酚和黄芩素等。研究表明血必清注射液可通过调节免疫功能发挥抗病毒作用,且有明确的抗炎机制,可能作为 COVID-19 的潜在抑制剂^[7]。槲皮素具有抗炎、抗氧化、调节免疫和保护心肌缺血再灌注损伤等作用。槲皮素可通过抑制核因子 κ B 信号通路减少核因子 κ B 的产生,从而达到抗炎的作用^[8]。木犀草素能抑制流感病毒的增殖和炎症细胞因子的表达,影响 Toll 样受体通路和凋亡相关因子的表达,减轻

病毒对宿主细胞的免疫损伤,发挥抗病毒作用^[9]。 β -谷甾醇对脂多糖致急性肺损伤有一定的保护作用,亦可改善非酒精性脂肪肝患者肝细胞脂肪变性程度,减轻氧化应激反应,从而对肝脏起到保护作用^[10]。研究表明,山奈酚具有良好的抗菌活性,对耐甲氧青霉素的金黄色葡萄球菌也有作用,在抗病毒方面,山奈酚在非细胞毒性浓度呈浓度依赖性抑制。黄芩素可减弱炎症反应、氧化应激及肺组织细胞凋亡,可能通过抑制 p38 MAPK 通路发挥对肺组织的保护作用^[11];同时可抑制新生血管形成,通过降低血压和扩张血管等方式发挥保护心脑血管的作用;亦可直接清除活性氧,减轻缺血再灌注心肌细胞氧化应激反应,提高心肌细胞的生物功能和存活率^[12]。

表 1 血必清注射液治疗 2019-nCoV 感染合并心肌炎的主要生物学过程(前 20 个)

ID	生物学过程名	参与通路数
1	细胞因子受体结合	17
2	细胞因子激活	13
3	受体配体激活	13
4	生长因子受体结合	7
5	磷酸酶结合	7
6	G 蛋白偶联受体结合	7
7	趋化因子受体结合	6
8	蛋白磷酸酶结合	6
9	蛋白磷酸酶结合 DNA 结合转录激活过程, RNA 聚合酶 II 特异性	6
10	细胞黏附分子结合	6
11	趋化因子活性	5
12	整合素结合	5
13	辅酶结合	5
14	泛素样蛋白连接酶结合	5
15	丝氨酸/苏氨酸激酶激活	5
16	肿瘤坏死因子受体超家族结合	4
17	蛋白酶结合	4
18	血红素结合	4
19	四吡咯结合	4
20	核激素受体结合	4

通过蛋白互作网络分析筛选出血必清注射液作用于 2019-nCoV 感染合并心肌炎的关键靶点,包括 IL-6、IL-10、ALB、CXCL8 和 IL-1 β 等,分析发现这些靶点主要与炎症反应、免疫调控以及细胞的增殖、分化和凋亡等密切相关。IL-6 和 IL-10 在炎症反应中起重要作用,能参与免疫反应的细胞增殖和分化^[13]。研究表明宿主细胞可通过蛋白的泛素化修饰抑制 MAPK/ERK 通路,从而抑制病毒感染^[14]。

GO 和 KEGG 富集结果表明血必清注射液通过多种生物学过程和多条信号通路参与 2019-nCoV 感染合并心肌炎的治疗过程。从 GO 富集分析结果可得知,共同靶点主要涉及生物学过程有细胞因子受体结合、

细胞因子活性、受体配体活性、磷酸酶结合和趋化因子受体结合等。KEGG 通路富集分析结果显示,血必清注射液作用于 2019-nCoV 感染合并心肌炎的靶点主要涉及糖尿病并发症相关的 AGE-RAGE 信号通路、IL-17 信号通路、肿瘤坏死因子(TNF)信号通路、Toll 样受体信号通路及多种疾病等多条通路。其中,糖尿病并发症相关的 AGE-RAGE 信号通路、IL-17 信号通路和 TNF 信号通路已被证实与 2019-nCoV 感染相关^[15]。糖尿病并发症中的 AGE-RAGE 信号通路与血管损伤、炎症反应和动脉粥样硬化密切相关,通路激活可导致活性氧过量产生,核因子 κ B 活化,黏附因子和细胞因子表达增加^[16]。TNF 信号通路和 IL-17 信号通路均能

调控细胞凋亡,是炎症反应过程中重要的通路。Toll 样受体信号通路是免疫反应过程中的重要通路,三萜类化合物可通过 Toll 样受体信号通路减轻脂多糖引起

的心肌功能障碍^[17]。由此推测,血必清注射液是通过抑制炎症反应,调节免疫功能和调控细胞凋亡来治疗 2019-nCoV 感染合并心肌炎。

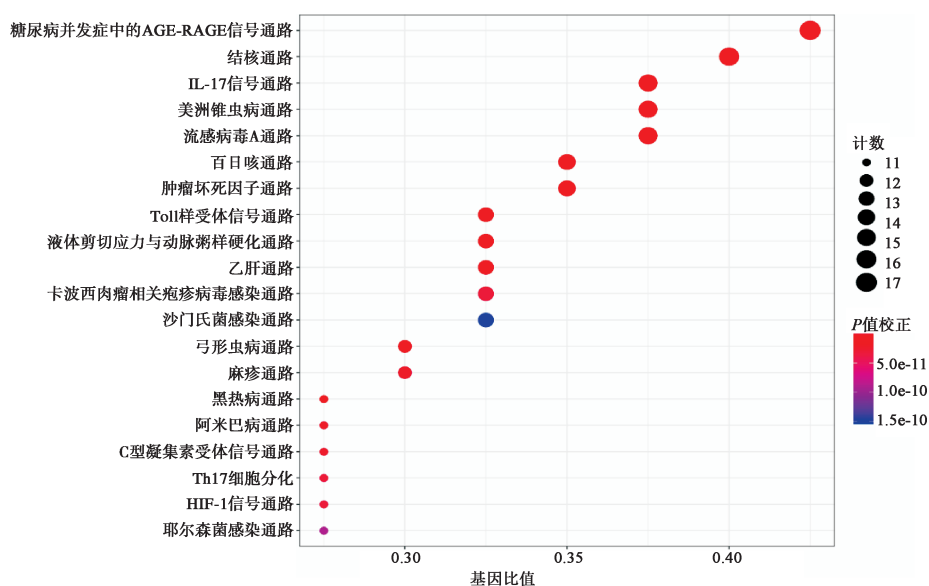


图4 血必清注射液治疗 2019-nCoV 感染合并心肌炎的主要通路(前 20 条)

综上所述,本研究基于网络药理学的方法探讨了血必清注射液作用于 2019-nCoV 感染合并心肌炎的活性成分及可能的作用机制,结果显示血必清注射液的主要活性成分为槲皮素、木犀草素、 β -谷甾醇、山奈酚和黄芩素,其主要通过调节 IL-6、IL-10、ALB、CXCL8、IL-1 β 、MAPK8 和 CASP3 等靶点,调控 AGE-RAGE、IL-17 和 TNF 等信号通路来抑制炎症反应,调节免疫功能和调控细胞凋亡,从而达到治疗 2019-nCoV 感染合并心肌炎的目的。本研究仍存在一定的局限性,如网络药理学基于数据进行的研究,有关疾病和药物的资料收集的结果可能不全面,以及通过数据库筛选出的中药活性成分可能与实际吸收进入人体循环的药物成分有差异。因此仍需进一步的实验来验证本研究结果。

参考文献

- [1] Zhou P, Yang XL, Wang XG, et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin[J]. Nature, 2020, 579(7798): 270-273.
- [2] 郭栋, 郭万刚, 刘鹏云, 等. 新型冠状病毒感染的心脏表现[J/OL]. 心脏杂志, 2020, 32(1): 1-3.
- [3] 高树明, 马英, 杨丰文, 等. 张伯礼: 中医药在防治新型冠状病毒肺炎全过程发挥作用[J]. 天津中医药, 2020, 37(2): 121-124.
- [4] Pu JY, He L, Wu SY, et al. Anti-virus research of triterpenoids in licorice[J]. Bing Du Xue Bao, 2013, 29(6): 673-679.
- [5] 秦裕辉, 胡方林, 葛金文. 新冠系列方预防新型冠状病毒感染用方探讨[J]. 湖南中医药大学学报, 2020, 40(2): 129-133.

- [6] Hopkins AL. Network pharmacology: the next paradigm in drug discovery[J]. Nat Chem Biol, 2008, 4(11): 682-690.
- [7] Takashima K, Matsushima M, Hashimoto K, et al. Protective effects of intratracheally administered quercetin on lipopolysaccharide-induced acute lung injury[J]. Respir Res, 2014, 15(1): 150.
- [8] 陈奎香, 李素娟, 罗健东, 等. 槲皮素通过抑制蛋白酶体活性减轻心肌细胞肥大[J]. 中国病理生理杂志, 2015, 31(8): 1352-1359.
- [9] Birt DF, Hendrich S, Wang W. Dietary agents in cancer prevention: flavonoids and isoflavonoids[J]. Pharmacol Ther, 2001, 90(2-3): 157-177.
- [10] Williams J, Andersen W. Bringing ontology to the gene ontology[J]. Comp Funct Genomics, 2003, 4(1): 90-93.
- [11] Cinalt J, Morgenstern B, Bauer G, et al. Glycyrrhizin, an active component of liquorice roots, and replication of SARS-associated coronavirus[J]. Lancet, 2003, 361(9374): 2045-2046.
- [12] Kanehisa M, Goto S. KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes[J]. Nucleic Acids Res, 2000, 28(1): 27-30.
- [13] 李梅. 老年慢性支气管哮喘患者血清 TNF- α 、IL-6 水平及其临床意义[J]. 放射免疫学杂志, 2005, 18(6): 440-441.
- [14] Wang C, Liu H, Luo J, et al. HA triggers the switch from MEK1 SUMOylation to phosphorylation of the ERK pathway in influenza A virus-infected cells and facilitates its infection[J]. Front Cell Infect Microbiol, 2017, 7: 27.
- [15] 许冬玉, 许玉龙, 王至婉, 等. 基于网络药理学研究清肺排毒汤治疗新型冠状病毒肺炎的作用机制[J]. 中药药理与临床, 2020, 36(1): 26-32.
- [16] Piperi C, Goumenos A, Adamopoulos C, et al. AGE/RAGE signalling regulation by miRNAs: associations with diabetic complications and therapeutic potential[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2015, 60: 197-201.
- [17] Noack M, Miossec P. Selected cytokine pathways in rheumatoid arthritis[J]. Semin Immunopathol, 2017, 39(4): 365-383.

收稿日期: 2020-03-14