

苦参治疗 2019 新型冠状病毒感染合并心肌炎的网络药理学分析

杨晓倩 秦莉 张艺文 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 采用网络药理学方法探讨苦参治疗 2019 新型冠状病毒(2019-nCoV)感染合并心肌炎的活性成分及作用机制。**方法** 利用 TCMSP 数据库获得苦参的活性成分及其相关靶点,并在 GeneCards 数据库和 OMIM 数据库中查找 2019-nCoV 和心肌炎的靶点;使用 R 软件预测苦参作用于 2019-nCoV 感染合并病毒性心肌炎的作用靶点,并利用 Cytoscape3.7.2 软件构建“药物-活性成分-疾病-靶点”的网络;通过 String 数据库进行蛋白质相互作用分析,并筛选关键靶点;采用 R 软件进行基因本体(GO)富集分析和京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路分析。**结果** 筛选得到苦参作用于 2019-nCoV 心肌炎的活性成分 14 个,作用靶点 34 个。富集分析显示,作用靶点主要涉及 63 个生物学功能和 135 条通路。**结论** 苦参可能通过多成分、多靶点和多通路的共同作用发挥抗 2019-nCoV 心肌炎的作用。

【关键词】 苦参;新型冠状病毒;心肌炎;网络药理学

【DOI】10.16806/j.cnki.issn.1004-3934.2021.06.021

Network Pharmacological Analysis of Sophora Flavescens on Novel Coronavirus Infection Complicated with Myocarditis

YANG Xiaoqian, QIN Li, ZHANG Yiwen, WANG Han

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

【Abstract】Objective To explore the active ingredient and underlying mechanism of Sophora flavescens on novel coronavirus(2019-nCoV) complicated with myocarditis by using network pharmacology analysis. **Methods** The active ingredients and related targets of Sophora flavescens were obtained from TCMSP database, and targets of 2019-nCoV and myocarditis searched in GeneCards and OMIM database. R software was used to predict the targets of 2019-nCoV with myocarditis, and Cytoscape to build a “drug-active ingredient-disease-target” network. Protein interaction was analyzed in String database with key targets screened, and GO functional enrichment and KEGG metabolic pathway enrichment were analyzed with R software as well. **Results** 14 active ingredients and 34 targets of Sophora flavescens on 2019-nCoV complicated with myocarditis were screened out. Results of enrichment analysis indicated these targets were mainly involved with 63 biological functions and 135 signaling pathways. **Conclusion** Sophora flavescens may play a role in anti-2019-nCoV infection complicated with myocarditis through the joint action of multi-ingredients, multi-targets and multi-pathways.

【Key words】 Sophora flavescens; Novel coronavirus; Myocarditis; Network pharmacology

2019 新型冠状病毒(2019-nCoV)是一种比严重急性呼吸综合征(SARS)冠状病毒传播性更强的新型 β 冠状病毒,其基因序列与 SARS 具有很高的同源性,且都会导致严重的呼吸道疾病^[1-2]。2019-nCoV 感染的具有独特的流行病学特征的新型冠状病毒肺炎(COVID-19)人数远超 SARS,但病死率比 SARS 低得多,其临床症状主要表现为发热、乏力和干咳,少数患者有咽痛、腹泻和恶心等症状^[1-2]。通过对临床病例报告的分析发现,2019-nCoV 除感染肺部外,还会对心

血管系统产生影响,有临床病例显示,无心血管系统疾病的 COVID-19 患者在疾病发展过程中出现心肌受损^[3-4]。有学者认为 2019-nCoV 可能与 SARS-CoV 一样,能与在心血管系统中广泛表达的血管紧张素转换酶 II 受体结合直接感染心肌细胞,造成心肌损伤^[4]。研究发现,2019-nCoV 感染患者体内的 Th1 和 Th2 细胞的反应均增强,使体内炎性细胞因子释放增多,免疫系统激活^[4]。不论是病毒直接感染心肌细胞造成的心肌受损,还是由病毒引起的全身性炎症风暴和免疫

系统紊乱造成的心肌受损,都可能引起心肌细胞炎症反应,继而诱发病毒性心肌炎(viral myocarditis, VMC),其主要临床症状为发热、恶心、呕吐、心慌和胸痛等,严重者可能发生休克、心律失常、心力衰竭,甚至猝死,要及早治疗^[5]。

中国作为中医药大国,对病毒所致疾病的治疗有相当丰富的经验。在中医看来,此次 2019-nCoV 所致疫情的重要特征为“湿”邪,故可称为“湿毒疫”,其病位在肺,但可累及营血,逆传心包,气阴两虚,对于累及心包的重症患者,应以清热、化痰、活血、祛瘀和利水等为主要治疗方法;并且中医对 VMC 的看法是“以外感肺卫之邪,肺温热之毒,乘之入心而致病”,瘀和痰既是其病理产物又是致病因素,应祛痰化瘀^[6-8]。苦参是豆科植物苦参的根,在临床上具有清热燥湿、抗炎消炎、平喘祛痰和利尿利水等作用,对 2019-nCoV 感染合并 VMC(2019-nCoV 心肌炎)可能是有益的。并且已有研究证明,苦参成分中的苦参碱和槐定碱对 VMC 具有抗炎、抗病毒和抗心肌细胞凋亡等作用^[9]。为了阐明苦参对 2019-nCoV 心肌炎的有益作用,现通过网络药理学研究方法,在分子水平上对其可能的有效成分和作用机制进行全面的研究^[10]。

1 材料和方法

1.1 苦参成分和靶点的预测

在中药系统药理数据库和分析平台(TCMSP)中对苦参进行检索,得到苦参的活性成分,再以生物利用度(OB)≥30%和类药性(DL)≥0.18 对活性成分进行筛选,得到候选化合物,并查找候选化合物对应的靶点^[11]。在 UniProt 数据库中以“人源”为限定标准,将预测靶点的蛋白名转换成官方基因名,以便于后面的分析。

1.2 2019-nCoV 心肌炎的靶点预测

在 GeneCards 数据库和 OMIM 数据库中分别检索“novel coronavirus”(新型冠状病毒)和“myocarditis”(心肌炎),得到 2019-nCoV 和心肌炎各自的靶点,然后将它们进行取交集,得到共同靶点,即 2019-nCoV 心肌炎的潜在靶点。

1.3 “药物-活性成分-疾病-靶点”的网络构建

利用 R 软件中的“VennDiagram”程序包对苦参治疗 2019-nCoV 心肌炎的作用靶点进行预测,再通过预测到的靶点对上述得到的候选化合物进行筛选,得到与靶点相关的化合物。将作用靶点及其相关化合物导入 Cytoscape3.7.2 软件中,以药物、活性成分、疾病和靶点为节点,节点之间的连线为边,构建“药物-活性成分-疾病-靶点”网络。

1.4 蛋白互作网络构建及关键靶点筛选

通过 String 数据库,对药物作用于疾病的靶蛋白进

行蛋白质相互作用的网络分析。限定蛋白种类为“Homo sapiens”(人源),设置最低蛋白互作得分为 0.4,其余参数保持默认设置,以靶蛋白为节点,节点之间以边相连接。将得到的蛋白互作网络中,各靶蛋白所连接的节点数目进行排序,以连接节点数目排名前 10 的靶蛋白作为关键靶点。连接节点越多可认为在该网络中越关键,越有可能是药物作用于疾病的关键药效靶点。

1.5 基因本体及通路富集分析

利用 R 软件中的“clusterProfiler”安装包,对苦参作用于 2019-nCoV 心肌炎的作用靶点进行基因本体(GO)富集分析和京都基因与基因组百科全书(KEGG)代谢通路分析,得到苦参治疗 2019-nCoV 心肌炎可能涉及的生物学功能和通路。GO 分析中通过分子功能、生物过程和细胞组分三个模块对靶点进行注释,设定阈值为 $P < 0.05$, P 值大小表示富集显著性, P 值越小,富集越显著,可认为 $P < 0.05$ 的所有条目是重要生物学功能,并根据 P 值大小进行排序,列出显著富集的前 20 个生物学功能的基本信息。与 GO 分析一样,选取 KEGG 分析得到的所有 $P < 0.05$ 的通路,用显著富集的前 20 条通路,绘制气泡图,图中节点的大小表示富集在该通路的基因数目,节点的颜色表示 P 值大小,节点越红越大说明该通路越重要。

2 结果

2.1 药物和疾病的相关靶点

将 TCMSP 中检索到的活性成分及其相关靶点,经筛选、整合和去重后,最终得到活性成分 23 个,相关靶点 177 个。将 GeneCards 数据库和 OMIM 数据库检索到的疾病靶点整合和去重后,得到 2019-nCoV 相关靶点 348 个,其中 OMIM 数据库未单独收集心肌炎的相关靶点,改成“myocardial”(心肌)后重新检索,最终得到心肌炎相关靶点 987 个,二者取交集后,得到共同靶点 139 个,即 2019-nCoV 心肌炎的相关靶点。

2.2 “药物-活性成分-疾病-靶点”网络

在 R 软件中导入上述得到的苦参相关靶点和 2019-nCoV 心肌炎相关靶点,运行“VennDiagram”程序包,得到交集靶点 34 个,即苦参治疗 2019-nCoV 心肌炎的潜在靶点,进一步的筛选确定了苦参发挥抗 2019-nCoV 心肌炎的 14 个主要活性成分(见表 1)。再将这 34 个靶点及其相关的 14 个活性成分导入 Cytoscape3.7.2 软件,得到“药物-活性成分-疾病-靶点”网络(见图 1)。其中,黄色节点代表药物,红色节点代表疾病,蓝色节点代表成分,绿色节点代表靶点基因,各节点之间以边相连。通过这个网络,可知苦参主要是通过哪些成分以及这些成分是通过调控哪些靶点来产生对 2019-nCoV 心肌炎的治疗作用。

表 1 苦参抗 2019-nCoV 心肌炎的活性成分

活性成分编号	活性成分名称	OB(%)	DL
MOL003542	8-isopentenyl-kaempferol	38.04	0.39
MOL003627	sophocarpine	64.26	0.25
MOL003673	Wightone	42.80	0.36
MOL003680	sophoridine	60.07	0.25
MOL000392	formononetin	69.67	0.21
MOL005944	matrine	63.77	0.25
MOL000006	luteolin	36.16	0.25
MOL006596	glyceollin	97.27	0.76
MOL003347	hyperforin	44.03	0.60
MOL006604	(2S)-7-hydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-5-methoxy-8-(3-methylbut-2-enyl) chroman-4-one	48.09	0.39
MOL006613	kushenin	47.62	0.38
MOL006626	leachianone, g	60.97	0.40
MOL000098	quercetin	46.43	0.28
MOL000456	phaseolin	78.20	0.73

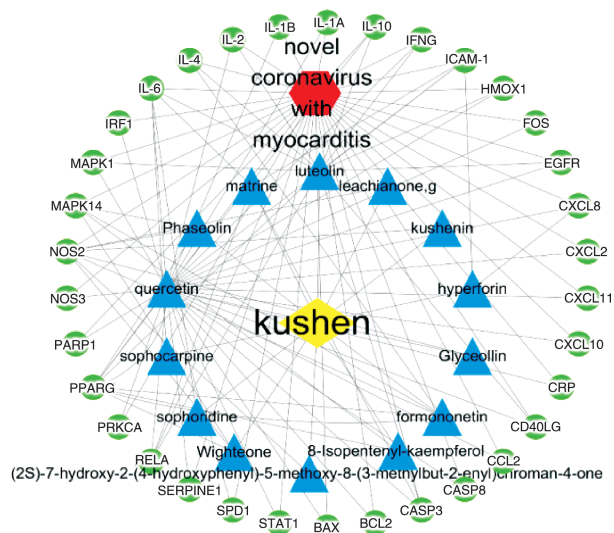


图 1 药物-活性成分-疾病-靶点网络图

注:黄色节点:苦参;红色节点:2019-nCoV 心肌炎;蓝色节点:苦参的有效活性成分;绿色节点:苦参和 2019-nCoV 心肌炎的共同靶点。

2.3 蛋白互作网络及关键靶点

在 String 数据库中对上述得到的 34 个作用靶点进行蛋白互作网络分析,结果(见图 2),图中显示出 34 个节点和 367 条边。节点代表靶基因,不同颜色的边代表不同的相互作用证据,两靶点之间的边越多,越能证明其具有相关性。利用 R 软件对各靶点连接的节点数目进行排序,得到排名前 10 的关键靶点(见图 3),其中白介素(IL)-6 连接了 31 个节点,是连接节点最多的靶点。各靶点连接节点越多,可认为其在该网络中越重要,越有可能是苦参治疗 2019-nCoV 心肌炎的主要药效靶点。

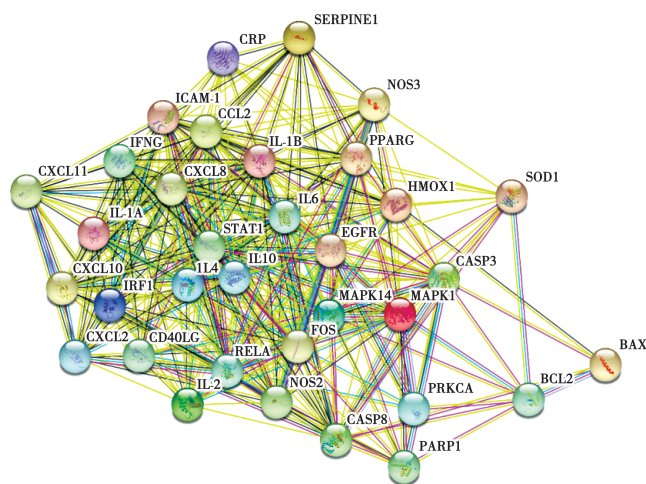


图 2 作用靶点的蛋白互作网络图

注:节点:靶点蛋白;不同颜色的连线代表不同的互动关系的证据。

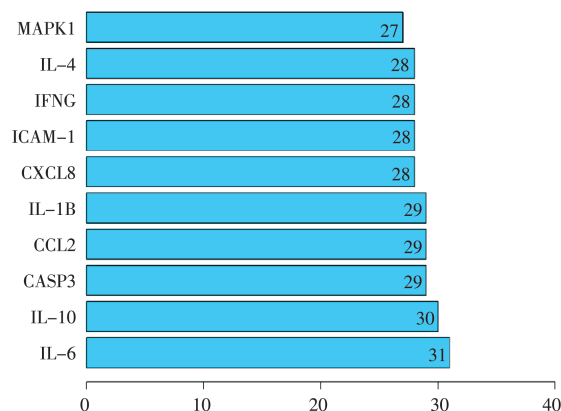


图 3 关键靶点

2.4 靶点的 GO 分析和 KEGG 分析

GO 分析结果显示共富集到 63 个与作用靶点相关的功能条目,以 P 值排序,前 20 个生物学功能见表 2。该结果显示,这些作用靶点主要涉及的生物学功能有细胞因子受体结合、细胞因子活性、受体配体活性、趋化因子受体结合、趋化因子活性、磷酸酶结合、生长因子受体结合和蛋白磷酸酶结合等。由此得出,苦参对 2019-nCoV 心肌炎的治疗作用参与了多种生物学进程。KEGG 分析得到 $P < 0.05$ 的通路 135 条,以 P 值排序,将前 20 条通路进行可视化分析

结果(见图 4)。该结果表明,苦参治疗 2019-nCoV 心肌炎的相关靶点主要参与 IL-17、肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)、Toll 样受体和缺氧诱导因子-1(hypoxia-inducible factor-1, HIF-1)等信号通路,涉及其他通路有糖尿病并发症中的 AGE-RAGE 信号通路、甲型流感通路、恰加斯病(美洲锥虫病)通路、百日咳通路和结核通路等,这表明苦参可通过不同的代谢通路,相互协调、相互合作来发挥治疗 2019-nCoV 心肌炎的作用。

表 2 苦参治疗 2019-nCoV 心肌炎的主要生物学功能(前 20 个)

序号	描述	基因数	P 值
1	细胞因子受体结合	16	4.20×10^{-18}
2	细胞因子活性	13	7.61×10^{-15}
3	受体配体活性	13	1.24×10^{-10}
4	趋化因子受体结合	6	1.15×10^{-7}
5	趋化因子活性	5	1.20×10^{-6}
6	磷酸酶结合	7	1.50×10^{-6}
7	生长因子受体结合	6	4.73×10^{-6}
8	蛋白磷酸酶结合	6	5.37×10^{-6}
9	G 蛋白偶联受体结合	7	1.66×10^{-5}
10	CXCR 趋化因子受体结合	3	1.84×10^{-5}
11	TNF 受体超家族结合	4	2.77×10^{-5}
12	TNF 受体结合	3	4.07×10^{-4}
13	整联蛋白结合	4	1.54×10^{-3}
14	BH 结构域结合	2	1.85×10^{-3}
15	死亡结构域结合	2	1.85×10^{-3}
16	生长因子活性	4	2.75×10^{-3}
17	氧化还原酶活性,作用于 NAD(P)H,血红素蛋白为受体	2	2.75×10^{-3}
18	泛素类蛋白连接酶结合	5	2.75×10^{-3}
19	MAP 激酶活性	2	2.94×10^{-3}
20	抑制转录因子结合	3	2.95×10^{-3}

3 讨论

COVID-19 是感染 2019-nCoV 所致的主要疾病,属于呼吸系统疾病。呼吸系统疾病与炎症反应密切相关,此次 2019-nCoV 所导致的体内炎症风暴可能波及心血管系统,造成心肌损伤,继而导致心肌炎^[3]。这与中医的整体观相契合,即人体是一个有机的整体,体内的五脏六腑是相互关联和相互影响的,其中心和肺是气和血相互依存关系的写照。苦参性寒凉,具有清热燥湿的作用,对于 2019-nCoV 的重要特征“湿邪”和 2019-nCoV 感染所致的“热证”可能有益;并且苦参的

抗炎消炎作用能减轻炎症反应造成的心肌损伤。

对于中药成分多、作用机制复杂的特点,本文采用网络药理学研究方法,通过活性成分筛选、作用靶点预测、网络构建和分析以及作用靶点功能和通路分析等过程,对苦参治疗 2019-nCoV 心肌炎的作用机制进行了探讨。研究发现,苦参中有 14 个活性成分可能通过直接或间接的方式作用于靶点发挥抗 2019-nCoV 心肌炎的作用,主要有香芹碱、槐定碱、苦参碱、木犀草素和槲皮素等。其中,苦参碱和槐定碱已被证明对 VMC 有治疗作用^[9]。进一步分析得到 34 个作用靶点,推测苦参

可能通过作用于这些靶点发挥作用。最后对作用靶点的功能和信号通路进行富集分析,结果显示:作用靶点主要涉及的生物学功能有细胞因子受体结合、细胞因子活性、受体配体活性、趋化因子受体结合、趋化因子活性、磷酸酶结合、生长因子受体结合、蛋白磷酸酶结合、G 蛋白偶联受体结合和 TNF 受体结合以及 TNF 受体超家族结合等,分析发现这些生物学功能主要与炎症反应以及细胞生长、增殖和凋亡等密切相关。通路富集结果显示,作用靶点主要参与调控 IL-17 信号通路、TNF 信号通

路、Toll 样受体信号通路、HIF-1 信号通路以及各种疾病通路等多种类型的通路,来发挥治疗作用,其中 IL-17、TNF、Toll 样受体和 HIF-1 等信号通路都与炎症反应密切相关,并且 IL-17 信号通路还参与了细胞纤维化进程, TNF 信号通路和 HIF-1 信号通路能调控细胞凋亡,推测苦参通过抑制炎症反应、心肌细胞纤维化和心肌细胞凋亡等来发挥抗 2019-nCoV 所致 VMC 的作用^[12-14]。总之,苦参是通过多成分、多靶点和多通路的共同作用发挥抗 2019-nCoV 心肌炎的作用。

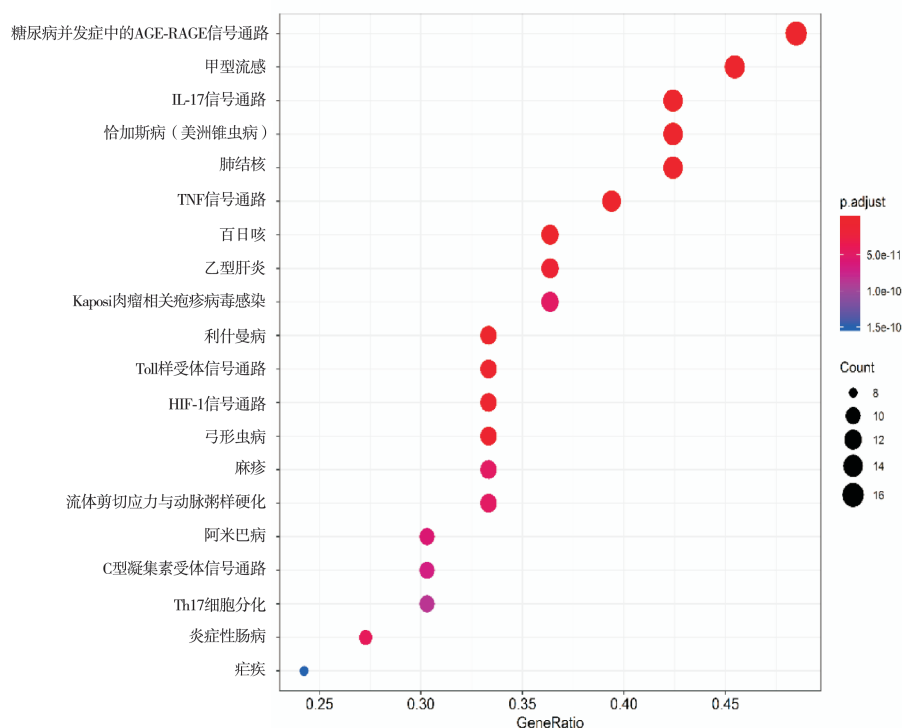


图4 苦参治疗 2019-nCoV 心肌炎的主要生物学通路(前 20 条)

在 34 个作用靶点中进一步筛选出 10 个关键靶点,分别是 IL-6、IL-10、CASP3、CCL2、IL-1B、CXCL8、ICAM-1、IFNG、IL-4 和 MAPK1。其中除 CASP3 和 MAPK1 外,都与炎症反应密切相关,IL-6 和 IL-4 能介导 T 细胞和 B 细胞活化和增殖,在炎症反应中起重要作用;IL-10 能抑制多种细胞因子的合成,从而抑制细胞免疫应答;CCL2 和 CXCL8 是趋化因子,能诱导炎症反应,CCL2 还能诱导其他炎性因子合成,如 IL-6;IL-1B 是促炎细胞因子,能活化 T 细胞和 B 细胞使细胞因子和抗体产生,促进炎症反应发生,另外,IL-1B 能促进成纤维细胞增殖和胶原蛋白产生,从而促进心肌细胞纤维化;ICAM-1 是细胞间黏附分子,是炎症发生的重要分子基础;IFNG 是 II 型干扰素(IFN- γ),具有免疫调节作用,促进巨噬细胞吞噬抗原、激活自然杀伤细胞和 T、B 淋巴细胞,增强机体免疫应答,并且 IFN- γ 还具有抗病毒活性^[13,15]。CASP3 参与负责凋亡执行

的胱天蛋白酶的激活级联反应,在细胞凋亡过程中起重要作用^[16]。MAPK1 主要参与细胞信号转导,是细胞增殖和分化的调节剂^[17]。这些基因的作用揭示了苦参可能通过调控免疫系统,抑制炎症反应、心肌细胞纤维化和心肌细胞凋亡或直接产生抗病毒作用等来发挥治疗 2019-nCoV 心肌炎的作用。

综上所述,本文基于网络药理学方法,挖掘了苦参治疗 2019-nCoV 心肌炎可能的活性成分及其相关作用靶点,对作用靶点进行了功能富集分析和通路富集分析,较全面地分析了其可能的作用机制,为临床上可能发生的 2019-nCoV 心肌炎的治疗提供了参考依据。

参考文献

- [1] 吕亚兰,刘聪,周文正,等. 新型冠状病毒肺炎与 SARS 和 MERS 的流行病学特征及其防控措施[J]. 医药导报,2020,39(3):334-337.

- [2] 王玉波,何勇. 新型冠状病毒肺炎诊治[J]. 重庆医学,2020,49(15):2432-2434.
- [3] 张梅,李闯. 新型冠状病毒肺炎与心血管疾病[J]. 武警医学,2020,31(2):93-96.
- [4] 郭栋,郭万刚,刘鹏云,等. 新型冠状病毒感染的心脏表现[J]. 心脏杂志,2020,32(1):81-83.
- [5] 陈文浩,张焕基,郭攸胜,等. 活检证实病毒性心肌炎的治疗策略及预后[J]. 心血管病学进展,2019,40(5):813-817.
- [6] 苗青,丛晓东,王冰,等. 新型冠状病毒感染的肺炎的中医认识与思考[J]. 中医杂志,2020,61(4):286-288.
- [7] 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.
- [8] 金信鑫,刘强. 中医药治疗病毒性心肌炎的研究进展[J]. 中国中医急症,2019,28(11):2050-2053.
- [9] 陈亚文,张曼,刘志军. 苦参对病毒性心肌炎的作用综述[J]. 临床医药文献电子杂志,2018,5(42):190-192.
- [10] Feng P, Che Y, Chen DQ. Molecular mechanism of action of Liuwei Dihuang pill for the treatment of osteoporosis based on network pharmacology and molecular docking[J]. *Eur J Integr Med*, 2020, 33: 101009.
- [11] Ru J, Li P, Wang J, et al. TCMSP: a database of systems pharmacology for drug discovery from herbal medicines[J]. *J Cheminform*, 2014, 6(1):13.
- [12] Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK. TH-17 cells in the circle of immunity and autoimmunity[J]. *Nat Immunol*, 2007, 8(4):345-350.
- [13] Rabiei N, Badi SA, Marvasti FE, et al. Induction effects of *Faecalibacterium prausnitzii* and its extracellular vesicles on toll-like receptor signaling pathway gene expression and cytokine level in human intestinal epithelial cells[J]. *Cytokine*, 2019, 121:154718.
- [14] Hu Z, Li H, Xie R, et al. Genomic variant in porcine TNFRSF1A gene and its effects on TNF signaling pathway in vitro[J]. *Gene*, 2019, 700:105-109.
- [15] Sonja T. NF- κ B-dependent upregulation of ICAM-1 by HPV16-E6/E7 facilitates NK cell/target cell interaction[J]. *Int J Cancer*, 2011, 128(5):1104-1113.
- [16] Guo X, Dong Z, Yamada S, et al. Association of Casp3 microRNA target site (1049216) SNP with the risk and progress of cervical squamous cell carcinoma[J]. *Int J Gynecol Cancer*, 2017, 27(2):206-213.
- [17] Garakani K, Shams H, Mofrad MRK. Mechanosensitive conformation of vinculin regulates its binding to MAPK1[J]. *Biophys J*, 2017, 112(9):1885-1893.

收稿日期:2020-03-06

(上接第 559 页)

- [15] Guo HW, Xu JP, Chang Y, et al. Coronary sinus approach to repair an intracardiac ventricular pseudoaneurysm[J]. *J Card Surg*, 2012, 27(6):692-695.
- [16] 周晓辉,许建屏. 二尖瓣机械瓣置换术后左心室假性室壁瘤成功修补一例[J]. 中国循环杂志,2013,28(5):329.
- [17] Inoue T, Hashimoto K, Sakamoto Y, et al. Spontaneous closure of a large left ventricular pseudoaneurysm after mitral valve replacement[J]. *Gen Thorac Cardiovasc Surg*, 2016, 64(6):337-339.
- [18] Neupane S, Kommuri NV, Kazanji N, et al. Left ventricular pseudoaneurysm after mitral valve replacement[J]. *Echocardiography*, 2016, 33(11):1788-1789.
- [19] Arnaz A, Akansel S, Yalcinbas Y, et al. Transcatheter closure of left ventricular pseudoaneurysm after mitral valve replacement[J]. *Ann Thorac Surg*, 2020, 110(2):e123-e125.
- [20] Şahan E, Şahan S, Karamanlioglu M, et al. Left ventricular pseudoaneurysm after mitral valve replacement: review of pseudoaneurysms late after mitral valve replacement[J]. *Herz*, 2015, 40(5):778-782.
- [21] Meng X, Yang YK, Yang KQ, et al. Clinical characteristics and outcomes of left ventricular pseudoaneurysm: a retrospective study in a single-center of China [J]. *Medicine (Baltimore)*, 2017, 96(18):e6793.
- [22] Bassan R, Jasbik W, de Souza MA, et al. Subvalvular left ventricular pseudoaneurysm: a rare complication of mitral valve replacement[J]. *Cathet Cardiovasc Diagn*, 1981, 7(3):269-273.
- [23] Sakai K, Nakamura K, Ishizuka N, et al. Echocardiographic findings and clinical features of left ventricular pseudoaneurysm after mitral valve replacement[J]. *Am Heart J*, 1992, 124(4):975-982.
- [24] Fishbein GA, Fishbein MC. Mitral valve pathology[J]. *Curr Cardiol Rep*, 2019, 21(7):61.
- [25] Prêtre R, Linka A, Jenni R, et al. Surgical treatment of acquired left ventricular pseudoaneurysms[J]. *Ann Thorac Surg*, 2000, 70(2):553-557.
- [26] Antonic M, Djordjevic A, Mohorko T, et al. Left ventricular pseudoaneurysm following atrioventricular groove rupture after mitral valve replacement[J]. *SAGE Open Med Case Rep*, 2019, 7:2050313X18823456.
- [27] Sobczyk WL, Jones JW, McManus BM. Clinically occult "false-on-true" left ventricular aneurysm: association with late sudden death following mitral valve replacement[J]. *Am Heart J*, 1986, 112(5):1090-1092.

收稿日期:2020-12-29

橘皮素通过抑制 ERK1/2 信号通路干预小鼠腹主动脉瘤的进展

乔晓博^{1,2} 罗倩文² 赵鹏³ 刘冉² 王乐² 吕晓² 张明明¹

(1. 河北省人民医院检验科, 河北 石家庄 050051; 2. 华北理工大学临床医学院, 河北 唐山 063210; 3. 河北医科大学研究生学院, 河北 石家庄 050051)

【摘要】目的 探讨橘皮素对小鼠腹主动脉瘤模型的治疗机制。**方法** 采用 7~8 周龄雄性 ApoE^{-/-} 小鼠行血管紧张素 II 灌注并高脂饲养方法构建腹主动脉瘤模型, 超声筛选造模成功的小鼠, 随机分为对照组(生理盐水)和治疗组(橘皮素), 每组各 10 只。治疗组每日给予 1 次灌胃橘皮素 100 mg/kg, 对照组给予等量生理盐水, 4 周后取材瘤体组织并石蜡包埋, 行 Masson 和 EVG 法染色观察各组小鼠主动脉壁的病理和胶原沉积的变化, Western blot 检测橘皮素对小鼠主动脉组织中 ERK1/2 信号通路的影响, 免疫荧光染色检测主动脉壁 MMP-2 和 MMP-9 的表达。**结果** 与对照组比较, 治疗组血管紧张素 II 诱导的主动脉直径的扩张和动脉壁弹力纤维的损坏均有一定程度的减轻($P < 0.05$); 治疗组小鼠腹主动脉组织中 ERK1/2 及其磷酸化表达水平均下降($P < 0.05$), MMP-2 和 MMP-9 的表达量同样减少($P < 0.05$)。**结论** Notch1 信号抑制剂橘皮素同样能通过抑制 ERK1/2 信号通路和 MMP-2、MMP-9 的表达延缓小鼠动脉瘤的进展。

【关键词】 橘皮素; 动脉瘤; ERK1/2; 信号通路

【DOI】 10.16806/j.cnki.issn.1004-3934.2021.06.022

Tangeretin Attenuates Mouse Abdominal Aortic Aneurysm via Inhibiting ERK1/2 Signaling Pathway

QIAO Xiaobo^{1,2}, LUO Qianwen², ZHAO Peng³, LIU Ran², WANG Le², LYU Xiao², ZHANG Mingming¹

(1. Department of Clinical Laboratory, Hebei General Hospital, Shijiazhuang 050051, Hebei, China; 2. School of Clinical Medicine, North China University of Science and Technology, Tangshan 063210, Hebei, China; 3. Graduate School of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050051, Hebei, China)

【Abstract】Objective To explore the therapeutic effect of Tangeretin on progression of abdominal aortic aneurysm (AAA) in mice. **Methods** 7~8 week of male ApoE^{-/-} mice were perfused with angiotensin II (Ang II) and fed with high fat diet to establish AAA model. The AAA mice screened by ultrasound were randomly divided into control group (normal saline) and treatment group (Tangeretin) with each group of 10 mice. Mice in treatment group were gavaged with Tangeretin (100 mg/kg) once a day, and control group with same amount of saline. After 4 weeks, aneurysm tissues were harvested and embedded in paraffin. Masson and elastic-van Gieson staining (EVG) were performed to assess pathological changes of aorta wall and collagen deposition respectively in each group. Western blot was used to detect the effect of Tangeretin on ERK1/2 signaling pathway in mouse aortic tissue, and the expression of MMP-2 and MMP-9 in aortic wall were detected by immunofluorescence staining (IF). **Results** Compared with control group, the diameter dilation of Ang II induced AAA and destruction of elastic fibers in arterial wall were alleviated in treat group ($P < 0.05$), levels of ERK1/2 protein and its phosphorylation in abdominal aortic wall tissue were decreased ($P < 0.05$) and expressions of MMP-2 and MMP-9 were also decreased ($P < 0.05$). **Conclusion** Notch1 signaling inhibitor Tangeretin can attenuate the progression of AAA by inhibiting ERK1/2 signaling pathway and expressions of MMP-2 and MMP-9 in ApoE^{-/-} mice.

【Key words】 Tangeretin; Aneurysm; ERK1/2; Signaling pathway

腹主动脉瘤(abdominal aortic aneurysm, AAA)是动脉管壁在病理因素的作用下局部发生病变或损伤后

于薄弱处向外膨出而发生的扩张, 瘤体一旦发生破裂, 死亡率高达 80%, 严重威胁中老年人的生命健康^[1]。

基金项目: 河北省科技厅项目(20377776D)

通信作者: 张明明, E-mail: zhangmm197612@126.com

炎症反应、平滑肌细胞凋亡、细胞外基质降解、胶原蛋白沉积和血管弹力纤维断裂是主要病理学特征^[2]。随着动脉管壁的逐渐变薄,无法阻抗动脉血流的压力时便发生破裂。胞外信号调节激酶(extracellular signal-regulated kinase, ERK)通过磷酸化的形式可将细胞外各种信息传递至细胞核内,促进细胞增殖和分化等相关蛋白的转录激活^[3], ERK1/2 信号的过度激活和基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP)-2 和 MMP-9 的高表达均与 AAA 相关^[4-5]。另外, Notch 信号通路可通过调节炎症反应促进 AAA 的病理进程^[6-7], 并且与其他细胞内信号通路相互作用, 例如 c-Jun^[8] 和 ERK1/2^[9] 等。

橘皮素是于橘皮中提取出来的一种天然化合物, 可特异性抑制 Notch1 受体蛋白的表达, 并在抵抗炎症反应和阻断氧化应激等方面发挥着重要作用^[10]。研究表明, 橘皮素可抑制炎症因子介导的炎症细胞的释放以及 ERK1/2 的磷酸化, 对动脉炎症性疾病如动脉粥样硬化的发生和发展起到一定程度的抑制作用^[11], 但橘皮素是否通过 ERK1/2 信号抑制 AAA 的发展仍未见报道。因此, 课题组通过构建小鼠 AAA 模型去证实 Notch1 信号抑制剂橘皮素是否能抑制 AAA 的进展以及是否与 ERK1/2 信号通路的干预相关, 为临床 AAA 的药物治疗提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验试剂

Notch1 抑制剂橘皮素(纯度为 98.98%)购于北京百奥莱博科技有限公司; 药物缓释泵(Alzet 公司)购于明阳科华生物科技有限公司; 血管紧张素 II 购于 Solarbio 公司; 吸入式麻醉剂异氟烷购于深圳市瑞沃德生命科技有限公司; ERK1/2 和 p-ERK1/2 抗体购于美国 Cell Signaling Technology 公司; 兔抗鼠抗体 MMP-2 和 MMP-9 购于 Abcam 公司; 抗体稀释液购于 Absin 公司; 凝胶配制试剂盒(SDS-PAGE Gel Kit)、二辛可宁酸蛋白浓度测定试剂盒、总蛋白提取试剂盒、硝酸纤维素膜(Immobilon-Nc)均购于 Solarbio 公司; Masson 三色染色试剂盒(Solarbio 公司)、弹力纤维染色试剂盒(Servicebio 公司)、高脂饲料(含 0.15% 胆固醇、21% 脂肪, 美迪森公司)和抗荧光淬灭封片液(含 4', 6-二脒基-2-苯基吡啶)购于上海碧云天生物技术有限公司。

1.2 实验设备

低温离心机(天美科学仪器有限公司), Epoch CHS 酶标仪(赛默飞世尔公司), 石蜡切片机(徕卡显微系统贸易有限公司), 光学显微镜(日本奥林巴斯)和荧光显微镜(天津众邦企业国际贸易有限公司)。

1.3 小鼠 AAA 模型及样本制备

1.3.1 动物模型的建立

7~8 周龄雄性 ApoE^{-/-} 小鼠购自卡文斯实验动物有限公司[生产许可证号 SCXK(苏)2016-0010], 体重(22±1)g, 动物实验在河北省人民医院临床研究中心 SPF 级动物房[SYXK(冀)2015-0065]进行, 该动物实验经过了河北省人民医院医学伦理委员会的批准(201922)。以 1 000 ng·kg⁻¹·min⁻¹ 持续 4 周剂量的血管紧张素 II 缓释泵植入小鼠皮下, 同时用含 0.15% 胆固醇的高脂饲料常规饲养, 构建小鼠 AAA 模型, 超声检查评估腹主动脉扩张情况, 4 周后将造模成功的小鼠随机分为两组: 对照组和治疗组, 各 10 只, 治疗组中每只小鼠予以 100 mg/kg 的橘皮素溶液灌胃, 对照组给予同等剂量的生理盐水, 每日 1 次, 共 4 周。

1.3.2 标本取材

0.2% 戊巴比妥钠腹腔注射麻醉小鼠, 由下腹部向上剪开至颈部, 剥离肌肉及结缔组织, 充分暴露心脏及相连的血管和肾脏, 匀速输注 4 ℃ 肝素生理盐水冲洗心脏, 分离心脏、主动脉及肾脏, 剥离血管外膜脂肪组织后置于解剖显微镜下观察主动脉血管形态, 游标卡尺测量血管最大直径并拍照记录, 统计测量后进行分析。每组 5 只小鼠瘤体组织 4% 多聚甲醛固定, 石蜡包埋; 另外 5 只瘤体组织置于液氮中保存。

1.4 检测方法

1.4.1 Masson 染色

石蜡切片浸入二甲苯液中进行脱蜡, 梯度酒精入水处理后, 用免疫组化笔在载玻片上将组织画圈, Weigert 铁苏木素染色 10 min, 水洗后置于酸性乙醇液分化 1 min, 流水冲洗并滴加 Masson 蓝化液 5 min 返蓝, 再次冲洗, 丽春红品红染液滴染 10 min, 之后用磷钼酸溶液洗 3 min, 滴加苯胺蓝染液 3 min, 弱酸工作液洗 1 min, 质量分数为 95%、100% I 和 100% II 的酒精梯度脱水, 二甲苯透明, 中性树胶封片。

1.4.2 弹力纤维染色

制备好的石蜡切片依次脱蜡至水, 将酒精苏木素、三氯化铁和碘液按照 5:2:2 的比例混合为弹力纤维染色(Elastic Van Gieson, EVG)染液, 避光滴加至切片组织上 10 min, 水洗, 酸性乙醇分化液分化数秒, 水洗终止分化, 显微镜下控制分化程度, 直至弹力纤维呈紫黑色细丝状为佳, 苦味酸与酸性品红按 9:1 混合配置 VG 染液, 滴染 10 s 后浸入梯度酒精(95%、100% I 和 100% II)脱水, 二甲苯透明, 中性树胶封片。

1.4.3 Western blot 检测

取出冻存的血管组织, 用眼科剪剪碎, 置冰上充分研磨后加入组织裂解液, 4 ℃ 离心提取蛋白; 配制 SDS-

PAGE 凝胶,蛋白加样连接电泳,湿转法将蛋白转至聚偏二氟乙烯膜上,置于 5% 脱脂奶粉中封闭 2 h,滴加稀释后的一抗 4 ℃ 过夜, TBST 洗 5 min×5 次,置于带有辣根过氧化物酶的二抗溶液中振荡孵育 2 h, TBST 洗 5 min×5 次,滴加电化学发光液进行曝光显影。

1.4.4 免疫荧光染色

4 μm 切片石蜡切片,脱蜡至水,柠檬酸缓冲液高温高压抗原修复,冷却后磷酸缓冲盐溶液浸洗 5 次, 10% 山羊血清室温封闭 30 min,一抗(抗体 1:50 比例稀释)4 ℃ 孵育过夜, PBS 浸洗 5 次, 荧光二抗避光室温孵育 60 min, PBS 浸洗 5 次,抗荧光淬灭封片液染核并封片,于荧光显微镜下观察。

1.5 统计学分析

数据采用 SPSS 19.0 统计软件处理,计量资料以均数±标准差表示,两组间比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 认为差异具有统计学意义。

2 结果

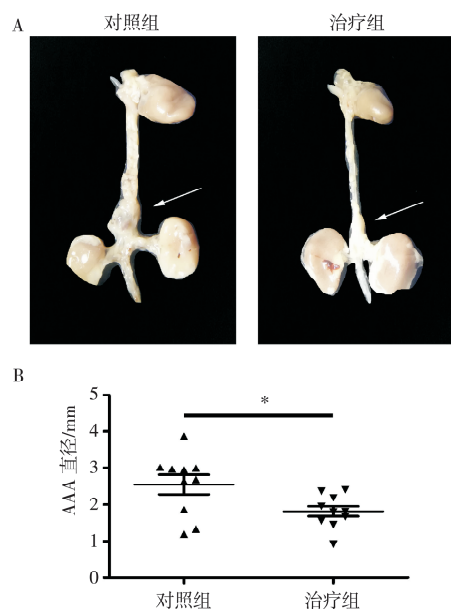
2.1 两组小鼠 AAA 的膨胀尺寸比较

测量两组小鼠瘤体尺寸后统计发现,与对照组相比,治疗组小鼠腹主动脉搏管的持续扩张明显被抑制 [(1.812 ± 0.143) mm vs (2.549 ± 0.265) mm, $n = 10$], 差异有统计学意义 ($P < 0.05$),如图 1 所示。

2.2 两组小鼠 AAA 的病理学观察

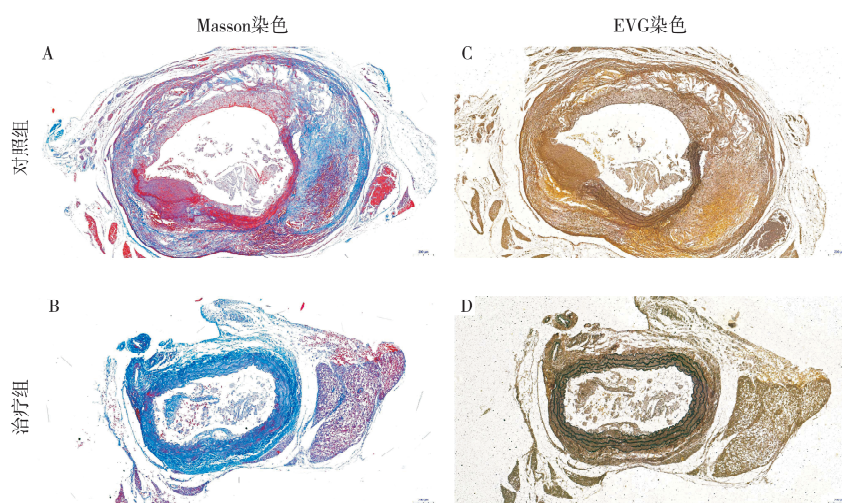
Masson 和 EVG 染色发现,对照组小鼠 AAA 腔体

增大,中膜层平滑肌细胞数减少且排列紊乱,胶原纤维溶解,含量减少;中层弹力蛋白结构破坏严重,原有曲度消失,甚至变直、变细和缺失,胶原沉积,断裂明显;经橘皮素干预后,AAA 组织形态较为完善,胶原纤维排列均匀,中膜层弹力蛋白结构相对完整,纵行分裂较少,连续性好,弹力纤维曲度可见。如图 2 所示。



注:组织形态学显示橘皮素减弱了 ApoE^{-/-}小鼠 AAA 的膨胀尺度 (* $P < 0.05$)。

图 1 橘皮素对小鼠 AAA 膨出直径的影响



注:A 和 B:Masson 染色中蓝色代表胶原纤维,橘皮素抑制了治疗组小鼠胶原纤维的溶解(放大倍数:10×);C 和 D:EVG 染色中黑色代表弹力纤维,和对照组相比,橘皮素治疗组小鼠弹力纤维相对完整(放大倍数:10×)。

图 2 Masson 和 EVG 染色两组小鼠 AAA 组织结果

2.3 两组小鼠 AAA 组织中 ERK1/2、p-ERK1/2、MMP-2 和 MMP-9 蛋白的表达

与对照组相比,100 mg/kg 的橘皮素治疗组

ApoE^{-/-}小鼠动脉瘤组织中 ERK1/2 蛋白表达无明显变化,而其活化形式 p-ERK1/2 活性降低,随之其下游分子蛋白 MMP-2 和 MMP-9 的蛋白表达亦有所下降,提

示橘皮素对 ERK 通路蛋白的调控作用,差异具有统计学意义($P<0.05$)。见图 3。

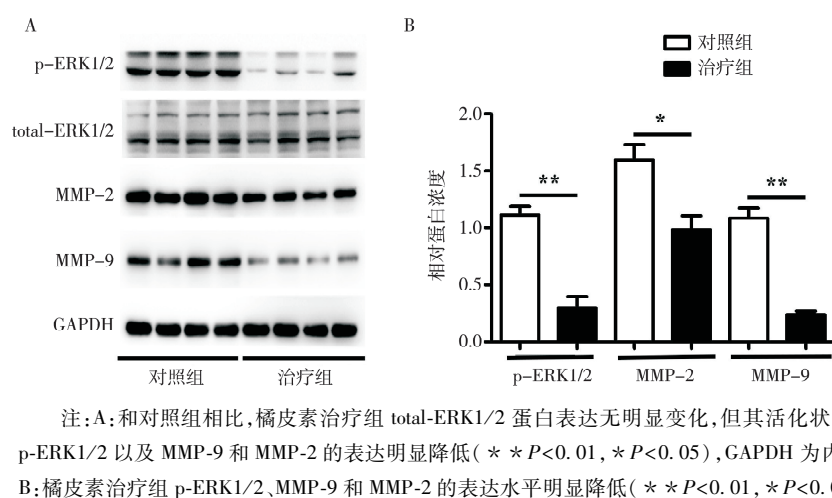
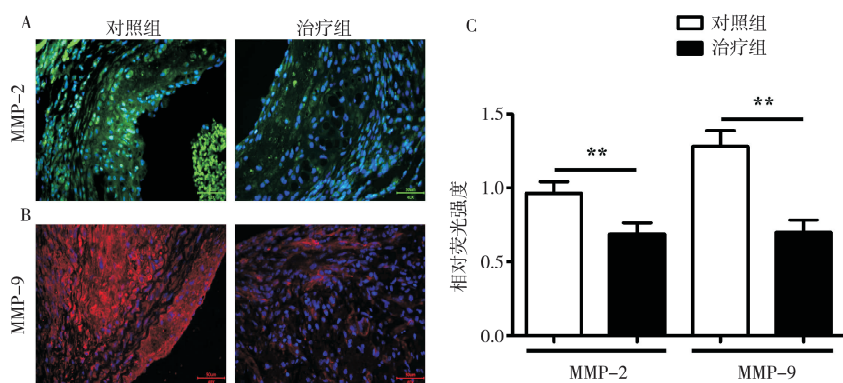


图 3 Western blot 检测两组小鼠 AAA 组织中 ERK 通路蛋白的表达

2.4 两组小鼠 AAA 组织中 MMP-2、MMP-9 的定位

免疫荧光染色结果显示,在 AAA 组织中 MMP-2 表达主要分布于血管中膜部分,MMP-9 主要分布在外

膜区域;并且与对照组比较,治疗组主动脉壁绿色和红色荧光的强度明显减弱,进一步表明橘皮素对 MMP-2 和 MMP-9 表达的抑制作用。见图 4。



注:A:绿色荧光区域代表 MMP-2 在各组小鼠 AAA 中的表达情况(放大倍数:40×);B:橙红色荧光区域代表 MMP-9 在各组小鼠 AAA 中的表达情况(放大倍数:40×);C:免疫荧光染色显示橘皮素降低了 MMP-2 和 MMP-9 在小鼠 AAA 中的表达 (** $P<0.01$)。

图 4 免疫荧光法检测橘皮素对 ERK 通路下游蛋白的影响

3 讨论

腹主动脉血管中膜层以层状排列的血管平滑肌细胞为主,其可分泌大量的弹性蛋白和细胞外基质,用以维持并修复血管壁正常弹性状态。在 AAA 的形成过程中,炎症反应诱导趋化因子的分泌,招募单核巨噬细胞等炎性细胞在血管壁聚集,大量的炎性细胞可降解细胞外基质并促使血管平滑肌细胞的凋亡,致使正常血管组织结构被破坏,血管稳态及顺应性降低,最终促进了血管壁的局部扩张。大量研究证实,动脉瘤的发生机制与炎症反应、氧化应激和 MMPs 家族的水解有关,而炎症反应贯穿于动脉瘤病程的始终^[12-13]。以巨噬细胞为主的炎症细胞聚集和炎性因子的释放激活血

管平滑肌细胞中 ERK 信号通路,该通路的激活促进 MMP-2 和 MMP-9 表达的上调,溶解细胞外基质成分,血管组织屏障进一步被破坏^[14]。

近年来研究发现,Notch1 信号通路可能是通过影响血管平滑肌细胞和巨噬细胞参与动脉粥样硬化和 AAA 的发展进程^[15],并且该信号通路 ERK 等多种信号传导途径交汇^[16]。并且在小鼠动脉瘤模型中,ERK 磷酸化水平明显高于正常小鼠,通过抑制 ERK 通路蛋白的活化可明显延缓 AAA 的进展^[17-18],提示 Notch1 可能是 ERK1/2 的上游信号并促进下游分子 MMP-2 和 MMP-9 的表达。本研究结果显示,在血管紧张素 II 诱导成功的小鼠 AAA 模型中,血管组织中

ERK 磷酸化水平显著升高且 MMP-2 和 MMP-9 蛋白表达量亦增加;与此同时,MMP-2 和 MMP-9 蛋白表达主要位于血管中膜和外膜组织,并伴随弹力纤维断裂以及大量胶原沉积,增加了动脉壁的扩张程度和动脉瘤破裂的风险;而在治疗组中小鼠的腹主动脉壁结构趋于相对完整,扩张度明显降低,胶原纤维分布均匀,弹力纤维断裂程度减缓,说明橘皮素显著保护了动脉壁结构的完整性,具有抑制 AAA 进展的作用。这与已有的橘皮素具有抗炎功能的报道结果一致。另外,橘皮素作为特异性阻断 Notch1 受体表达的天然产物^[19-20],具有毒副作用少的优势,配合其他信号分子化学抑制剂的效果值得进一步研究。

尽管本研究证实了橘皮素抑制小鼠 AAA 的作用是通过 ERK1/2 信号通路的干预,但以下几点限制仍值得研究者的关注:(1)对照组和治疗组中整体 Notch 家族 1~4 分子的表达情况如何需进一步检测,以期全面了解该信号通路在 AAA 中的作用;(2)橘皮素与 ERK1/2 信号抑制剂联合应用是否在抑制 AAA 进展中的作用更为突出;(3)细胞水平的分子机制阐述仍必不可少。

综上所述,橘皮素作为 Notch 信号通路抑制剂可通过与 ERK1/2 的通路相互作用延缓 AAA 扩张的进程,抗血管重塑并降低 AAA 破裂的风险,有望成为有效缓解和治疗 AAA 进展的药物分子。

参考文献

- [1] Altobelli E, Rapacchietta L, Profeta VF, et al. Risk factors for abdominal aortic aneurysm in population-based studies: a systematic review and meta-analysis [J]. *Int J Environ Res Public Health*, 2018, 15(12):2805-2816.
- [2] 夏良涛,余昕宇,魏翔. 腹主动脉瘤非手术治疗的研究进展[J]. *临床心血管病杂志*, 2020, 36(2):98-101.
- [3] Zou J, Lei T, Guo P, et al. Mechanisms shaping the role of ERK1/2 in cellular senescence[J]. *Mol Med Rep*, 2019, 19(2):759-770.
- [4] Li FF, Shang XK, Du XL, et al. Rapamycin treatment attenuates angiotensin II-induced abdominal aortic aneurysm formation via VSMC phenotypic modulation and down-regulation of ERK1/2 activity[J]. *Curr Med Sci*, 2018, 38(1):93-100.
- [5] Li Y, Wang W, Li L, et al. MMPs and ADAMs/ADAMTS inhibition therapy of abdominal aortic aneurysm[J]. *Life Sci*, 2020, 253:117659.
- [6] Sachdeva J, Mahajan A, Cheng J, et al. Smooth muscle cell-specific Notch1 haploinsufficiency restricts the progression of abdominal aortic aneurysm by modulating CTGF expression[J]. *PLoS One*, 2017, 12(5):e0178538.
- [7] Sharma N, Dev R, Ruiz-Rosado JD, et al. Pharmacological inhibition of Notch signaling regresses pre-established abdominal aortic aneurysm[J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1):13458.
- [8] 李方达,田翠,郑月宏,等. Notch 信号通路及其在腹主动脉瘤炎症相关发病机制中的研究进展[J]. *中华普通外科杂志*, 2013, 28(4):324-326.
- [9] Huang B, Jin G, Qu C, et al. Elevated expression of NOTCH1 associates with lymph node metastasis of gastric cancer and knock-down of NOTCH1 attenuates tumor cell progression[J]. *Med Sci Monit*, 2019, 25:9939-9948.
- [10] Liu LL, Li FH, Zhang Y, et al. Tangeretin has anti-asthmatic effects via regulating PI3K and Notch signaling and modulating Th1/Th2/Th17 cytokine balance in neonatal asthmatic mice[J]. *Braz J Med Biol Res*, 2017, 50(8):e5991.
- [11] Guo J, Chen J, Ren W, et al. Citrus flavone tangeretin is a potential insulin sensitizer targeting hepatocytes through suppressing MEK-ERK1/2 pathway[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2020, 529(2):277-282.
- [12] Jana S, Hu M, Shen M, et al. Extracellular matrix, regional heterogeneity of the aorta, and aortic aneurysm[J]. *Exp Mol Med*, 2019, 51(12):1-15.
- [13] Li H, Bai S, Ao Q, et al. Modulation of immune-inflammatory responses in abdominal aortic aneurysm: emerging molecular targets[J]. *J Immunol Res*, 2018, 2018:7213760.
- [14] Tsai S, Xian X. IL-33 in murine abdominal aortic aneurysm: a novel inflammatory mediator awaiting clinical translation[J]. *J Thorac Dis*, 2019, 11(6):2181-2184.
- [15] Koenig SN, LaHaye S, Feller JD, et al. Notch1 haploinsufficiency causes ascending aortic aneurysms in mice[J]. *JCI Insight*, 2017, 2(21):e91353.
- [16] Kong G, You X, Wen Z, et al. Downregulating Notch counteracts Kras^{G12P}-induced ERK activation and oxidative phosphorylation in myeloproliferative neoplasm[J]. *Leukemia*, 2019, 33(3):671-685.
- [17] Liu M, Li L, Zhu J, et al. Rapamycin attenuates a murine model of thoracic aortic aneurysm by downregulating the miR-126-3p mediated activation of MAPK/ERK signalling pathway[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2019, 512(3):498-504.
- [18] Wang Y, Zhang X, Gao L, et al. Cortistatin exerts antiproliferation and antimigration effects in vascular smooth muscle cells stimulated by Ang II through suppressing ERK1/2, p38 MAPK, JNK and ERK5 signaling pathways[J]. *Ann Transl Med*, 2019, 7(20):561-574.
- [19] Yang T, Feng C, Wang D, et al. Neuroprotective and anti-inflammatory effect of tangeretin against cerebral ischemia-reperfusion injury in rats [J]. *Inflammation*, 2020, 43(6):2332-2343.
- [20] Lee YY, Lee EJ, Park JS, et al. Anti-inflammatory and antioxidant mechanism of tangeretin in activated microglia[J]. *J Neuroimmune Pharmacol*, 2016, 11(2):294-305.

收稿日期:2020-12-01