

苦参治疗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-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 VMC 的作用靶点, 并利用 Cytoscape 3.7.2 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 GO 功能分析和 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.1004-3934.2020.00.000

Network Pharmacological Analysis of Sophora Flavescens for Novel Coronavirus Infection 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 active components and mechanism of *Sophora flavescens* for novel coronavirus with myocarditis by using network pharmacology. **Methods** The active ingredients and its related targets of *Sophora flavescens* was obtained by TCMSP database, and the targets of 2019-nCov and myocarditis were found in GeneCards database and OMIM database; the R software was used to predict the targets of novel coronavirus with myocarditis, and use Cytoscape software to build a "drug-active ingredient-disease-target" network; protein interaction was analyzed by String database and key targets were screened. The R software was used for KO function analysis and KEGG pathway analysis. **Results** Fourteen active components and 34 targets of *Sophora flavescens* were screened. The enrichment analysis showed that the targets mainly involved 63 biological functions and 135 pathways. **Conclusion** *Sophora flavescens* may play a role in anti-2019-nCov infection complicated with myocarditis through the joint action of multi-components, multi-targets and multi-pathways.

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

新型冠状病毒（2019-nCoV）是一种比严重急性呼吸系统综合征（SARS）冠状病毒传播性更强的新型 β 冠状病毒，因其基因序列与 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 除了感染肺部外，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 2 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、Th2 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（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“湿毒症”，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、祛瘀和利尿等为主要治疗方法；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、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 心肌炎（2019-nCoV 感染合并 VMC）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、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 OB（生物利用度） $\geq 30\%$ 和 DL（类药性） ≥ 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 UnitProt 数据库中以“人源”为限定标准，将预测到的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 合并心肌炎的靶点预测

在 GeneCards 数据库和 OMIM 数据库中分别检索“novel coronavirus”（新冠病毒）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（Node），节点之间的连线为边（Edge），构建“药物-活性成分-疾病-靶点”网络。

1.4 PPI 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 PPI 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 GO 功能富集分析和 KEGG 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 GO (gene ontology) 功能分析和 KEGG (KEGG pathway analysis) 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 (molecular function)、生物过程 (biological process)、细胞组分 (cellular components) 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,可知道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

Mol ID	Mol Name	OB/%	DL
MOL003542	8-Isopentenyl-kaempferol	38.04	0.39
MOL003627	sophocarpine	64.26	0.25
MOL003673	Wighteone	42.80	0.36
MOL003680	sophoridine	60.07	0.25
MOL000392	formononetin	69.67	0.21
MOL005944	matrine	63.77	0.25

Mol ID	Mol Name	OB/%	DL
MOL000006	luteolin	36.16	0.25
MOL006596	Glyceollin	97.27	0.76
MOL003347	hyperforin	44.03	0.6
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	0.4
MOL000098	quercetin	46.43	0.28
MOL000456	Phaseolin	78.20	0.73

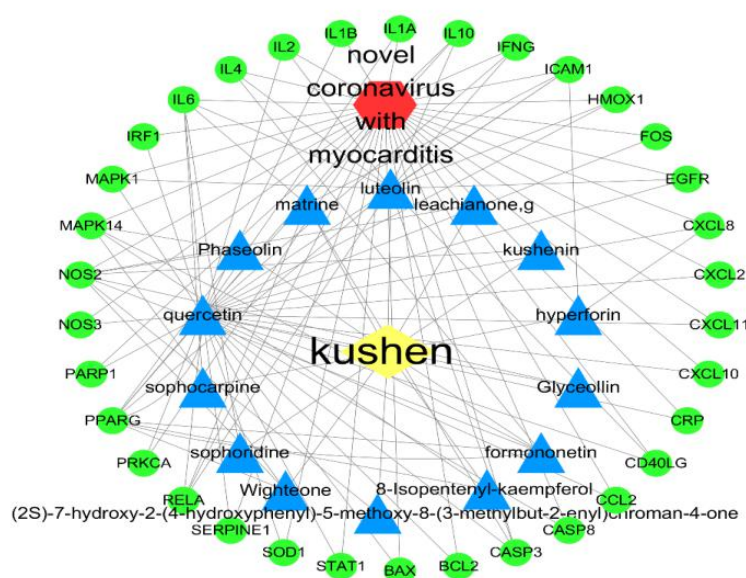


图 1 药物-活性成分-疾病-靶点网络图

2.3 PPI 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 PPI 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。

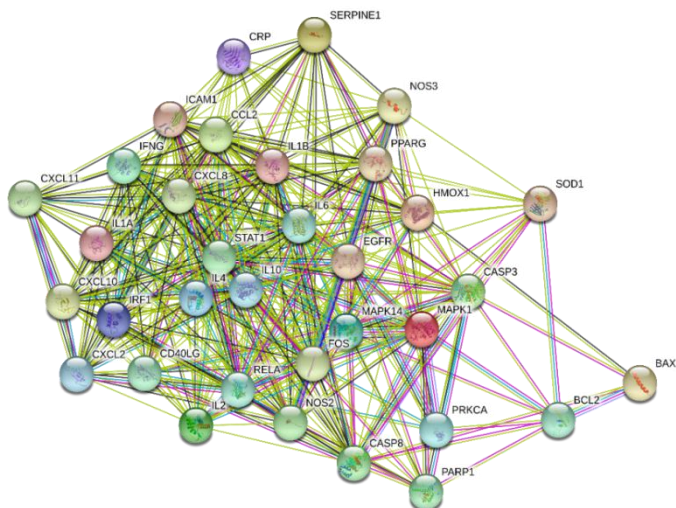


图 2 作用靶点的蛋白互作网络图

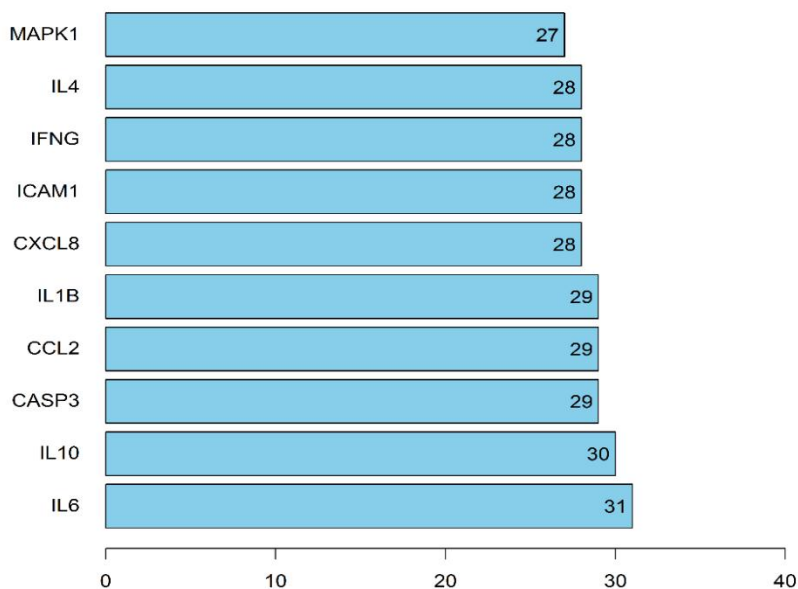


图 3 关键靶点

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 (TNF)、Toll 样受体和缺氧诱导因子-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 (美国锥虫病) 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	cytokine receptor binding	16	4.20×10 ⁻¹⁸
2	cytokine activity	13	7.61×10 ⁻¹⁵
3	receptor ligand activity	13	1.24×10 ⁻¹⁰
4	chemokine receptor binding	6	1.15×10 ⁻⁷
5	chemokine activity	5	1.20×10 ⁻⁶
6	phosphatase binding	7	1.50×10 ⁻⁶
7	growth factor receptor binding	6	4.73×10 ⁻⁶
8	protein phosphatase binding	6	5.37×10 ⁻⁶
9	G protein-coupled receptor binding	7	1.66×10 ⁻⁵
10	CXCR chemokine receptor binding	3	1.84×10 ⁻⁵
11	tumor necrosis factor receptor superfamily binding	4	2.77×10 ⁻⁵
12	tumor necrosis factor receptor binding	3	0.000407038
13	integrin binding	4	0.001543192
14	BH domain binding	2	0.001852247
15	death domain binding	2	0.001852247
16	growth factor activity	4	0.002747712
17	oxidoreductase activity, acting on NAD(P)H, heme protein as acceptor	2	0.002747712
18	ubiquitin-like protein ligase binding	5	0.002747712
19	MAP kinase activity	2	0.002942876
20	repressing transcription factor binding	3	0.00294657

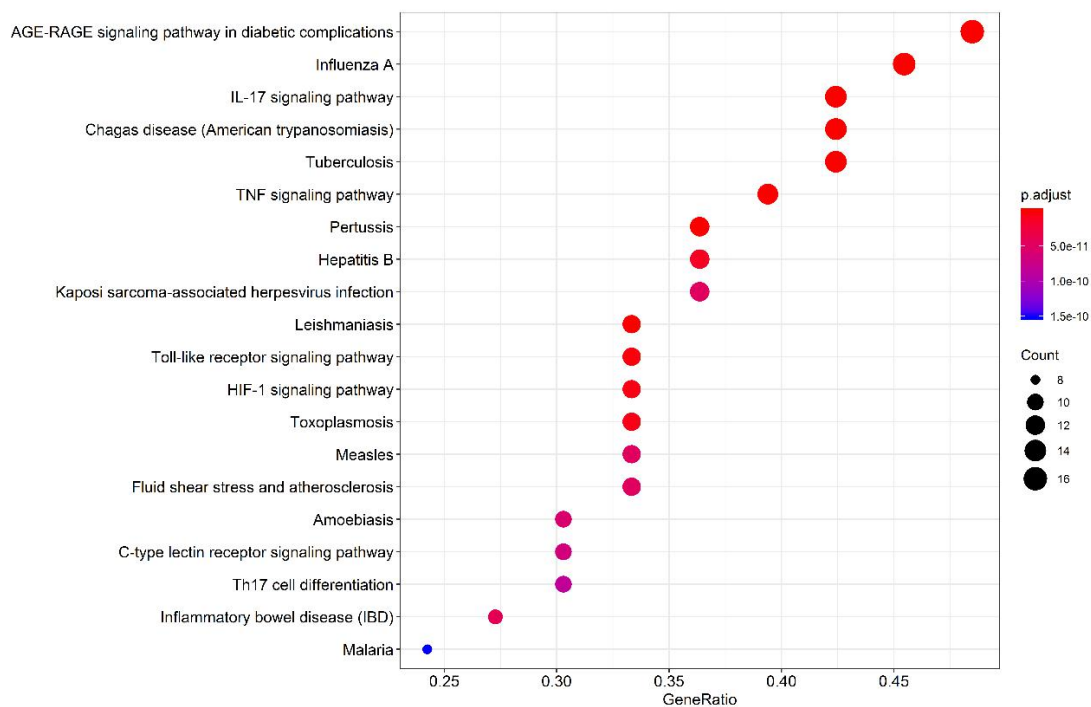


图 4 苦参治疗 2019-nCov 心肌炎的主要生物学通路（前 20 条）

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、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、肿瘤坏死因子受体结合以及肿瘤坏死因子受体超家族结合等,分析发现这些生物学功能主要与炎症反应,细胞生长、增殖、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、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、抑制心肌细胞纤维化、抑制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、多通路的共同作用发挥抗 2019-nCov 心肌炎的作用。

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、ICAM1、IFNG、IL-4、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、B 细胞活化、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;ICAM1 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(即 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、抑制心肌细胞纤维化、抑制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,2020,1-13.
- [2] 王玉波,何勇. 新型冠状病毒肺炎刍识[J]. 重庆医学,2020,1-4.
- [3] 张梅,李闯. 新型冠状病毒肺炎与心血管疾病[J]. 武警医学,2020,1-4.
- [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,2020,1-3.
- [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,2020,1-3.
- [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,2020,1-4.
- [8] 金信焱,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.
- [11] Ru J,Li P,Wang J, et al. TCMSP: a database of systems pharmacology for drug discovery from herbal medicines[J]. *J Cheminform*,2014,6:13.
- [12] Bettelli E,Oukka M,Kuchroo VKJN. TH-17 cells in the circle of immunity and autoimmunity[J]. *Nat Immunol*,2007,8(4):345-350.
- [13] Rabiei N,Ahmadi Badi S,Ettehad Marvasti F,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*,2011,5(128):1104-1113.
- [16] Xin G,Zhiming D,Sohsuke Y, 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