论文

中国知名大学及研究院所专栏 北京中医药大学专辑

动态网络模块分析丹酚酸 B 治疗冠心病作用机制

郑世超, 霍梦琪, 张燕玲*, 乔延江*

北京中医药大学中药学院中药基础与新药研究重点实验室, 北京 100102

* 联系人, E-mail: colleen_zhang@163.com; yjqiao@bucm.edu.cn

收稿日期: 2016-05-01; 接受日期: 2016-06-15

国家自然科学基金(批准号: 81430094, 81173522, 81573831)、北京市教育委员会共建项目和北京中医药大学自主课题项目(批准号: 2015-JYB-XS082)资助

摘要 丹酚酸 B 是丹参治疗冠心病的主要活性成分之一, 具有良好的防治冠心病疗效. 通过数据库检索及药效团筛选确定了丹酚酸 B 的作用靶点, 根据靶点蛋白相互作用信息构建其静态蛋白相互作用网络, 并整合冠心病表达谱构建疾病和正常状态下的共表达蛋白相互作用网络. 采用基于边聚类的快速模块识别算法 FAG-EC 对疾病状态的共表达网络进行模块分析和 GO 富集分析, 然后将获得的功能模块映射到正常状态下的共表达网络, 获得相对应的功能模块, 并对不同状态下的功能模块进行对比分析, 揭示模块在不同状态下动态变化信息; 基于模块功能分析, 结果显示, 丹酚酸 B 主要通过调节免疫/炎症反应、凝血、血液循环、花生四烯酸代谢、成纤维细胞生长因子受体信号传导途径、肾素-血管紧张素系统、脂质代谢以及基础代谢等途径达到治疗冠心病的效果.

关键词 丹酚酸 B, 冠心病, 动态, 功能模块, 作用机制

丹酚酸 B(salvianolic acid B)是丹参治疗冠心病(coronary artery disease, CAD)的主要活性成分之一^[1], 药理研究结果证明其具有抗炎^[2]、抗纤维化^[3]、抗血栓^[4]、保护心肌^[5]和改善血液循环^[6]等作用, 以其为主要活性成分的冠心病稳定型心绞痛治疗药物“注射用丹参多酚酸盐”已上市^[7]. 目前, 文献报道的丹酚酸 B 治疗冠心病的作用机制研究主要集中在抗细胞凋亡以及保护心肌缺血/再灌注损伤, 而其他作用机制研究尚不清楚.

蛋白质是构成生物体的重要物质, 也是行使生物功能的重要生物大分子. 蛋白质通过蛋白-蛋白相互作

用(protein-protein interaction, PPI)在绝大数细胞水平的生物过程发挥重要作用, 如 DNA 复制与转录、酶控代谢反应和信号转导等, 因此研究和分析蛋白质相互作用成为理解生理活动中细胞组织、过程和功能的基础^[8]. 蛋白质相互作用网络(protein interaction network, PIN)是运用图论的方法直观地展现出生物体中 PPI 关系, 图中节点代表蛋白质或编码该蛋白质的基因, 边代表它们之间的相互作用. 目前, 蛋白相互作用实验含有假阳性与假阴性数据, 尽管随着实验方案和采用计算机模拟预测蛋白相互作用的方法已有很大改善, 但据估计高达 50% 的未筛选的酵母双杂交数据是错误

引用格式: 郑世超, 霍梦琪, 张燕玲, 等. 动态网络模块分析丹酚酸 B 治疗冠心病作用机制. 中国科学: 生命科学, 2016, 46: 929-939

Zheng S C, Huo M Q, Zhang Y L, et al. Mechanism of salvianolic acid B treating coronary artery disease based on dynamic network modules. Sci Sin Vitae, 2016, 46: 929-939, doi: 10.1360/N052016-00020

的^[9,10]; 同时只依赖单一“组学”数据信息分析, 容易造成生物活动过程生物学信息缺失^[11], 因此两种数据源发掘的生物学信息比单独任一数据源所发掘的生物学信息更准确^[12]. 故整合 PIN 和疾病基因表达谱两种数据源, 其中在 PIN 中被表达谱中显著性相关基因对所表达的 PPI 称为共表达蛋白-蛋白相互作用信息 (coexpression protein-protein interaction, CePPI), 基于 CePPI 构建的共表达蛋白相互作用网络 (coexpression protein interaction network, CePIN) 已被广泛用于关键节点辨识^[13]、阐释疾病分子机制^[14]等. CePPI 和 CePIN 有助于深入研究疾病相关的生物过程在不同状态的生物学动态变化, 有助于真正理解中药方剂及其关键药效组分的药理作用机制.

因此, 本研究通过构建丹酚酸 B 的静态 PIN, 并整合冠心病基因表达谱, 分别构建疾病状态和正常状态下的 CePIN, 且对疾病状态下的 CePIN 进行模块分析和功能注释. 通过不同状态下功能模块的对比分析, 揭示功能模块动态变化; 同时基于功能模块分析, 以期从分子网络水平上探讨丹酚酸 B 治疗冠心病的作用机制, 为其临床应用提供科学依据.

1 材料与方法

1.1 化合物对应靶点信息获取

丹酚酸 B 作用靶点信息来源于两部分, 一部分是基于数据库 ChEMBL^[15] (<https://www.ebi.ac.uk/chembl/>) 和 STITCH4.0^[16] (<http://stitch.embl.de/>) 检索. 其中 STITCH 数据库对每一个“成分-靶点”关系都有一个打分值, 本实验选择打分高于 0.7 的高置信度数据, 并对挖掘出的信息逐条检查, 以确保数据的可靠性^[17]. 另一部分来源于药效团虚拟筛选, 利用 DS2.5 的 ligand profile 模块, 基于实验室前期构建的与活血化瘀相关的 100 个药效团模型^[18,19], 搜索能与丹酚酸 B 匹配的药效团模型, 每个药效团与化学成分结构匹配有一个 Fit value 打分, 选取 Fit value 值大于 0.7 的药效团对应的靶点作为潜在的成分作用靶点.

1.2 共表达蛋白相互作用网络构建

(1) 静态蛋白相互作用网络构建. 相对于共表达网络, 基于数据库构建的网络称为静态蛋白相互作用网络. 靶点 PPI 信息来自于 String 9.1 数据库^[20], 包括直接(物理)和间接(功能)关联的相互作用. 该数

据库对于每一个 PPI 信息都有一个打分值, 打分值越高说明蛋白的相互作用置信度越高. 本文选取的是打分高于 0.7 的高置信度的数据, 以确保数据的可靠性^[17].

将获得的各个靶点的 PPIs 导入 Cytoscape 2.8.3^[21], 利用 Advanced Network Merge^[22] 插件对所有靶点的蛋白互作网络进行 union 计算, 去除重复边和自环边, 最终得到丹酚酸 B 的 PIN.

(2) 共表达网络构建. 冠心病基因表达谱获取于基因表达综合数据库 (gene expression omnibus, GEO)^[23] (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>). 采用的冠心病基因表达谱为 GSE42148, 包含 11 个正常样品和 13 个疾病样品.

通过整合冠心病基因表达谱和 PIN 分别构建正常和疾病特定状态下的 CePIN. 两个蛋白相互作用在基因表达谱中对应编码基因表达量在特定状态下呈现 Pearson 显著性相关 ($P \leq 0.05$), 即被显著性相关基因对编码的 PPI, 则为共表达蛋白-蛋白相互作用 (CePPI). 由 CePPIs 构成 CePIN. 在疾病状态下, 所有 CePPIs 构成的网络称为 CAD CePIN. 在正常状态下, 所有 CePPIs 构成的网络称为 non-CAD CePIN.

相互作用的蛋白对在基因表达谱中对应编码基因对 (X 和 Y) 的 Pearson 相关系数 r 表示为:

$$r = \frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n \left(\frac{X_i - \bar{X}}{S_X} \right) \left(\frac{Y_i - \bar{Y}}{S_Y} \right),$$

其中, n 表示特定状态下样本数; $X_i(Y_i)$ 表示特定状态下样品 i 基因 $X(Y)$ 的表达量; $\bar{X}(\bar{Y})$ 表示基因 $X(Y)$ 的平均表达量; $S_X(S_Y)$ 表示基因 $X(Y)$ 的表达量的标准偏差. r 的绝对值越大, 则基因对相关性越大.

1.3 共表达网络分析

(1) 不同状态下 CePIN 结构对比分析. 通过对不同状态下 CePIN 结构对比分析, 揭示隐藏在静态网络中的特定状态下的动态信息. 提取正常和疾病状态下 CePIN 的靶点, 分别将其映射到静态网络中, 获得不同状态下静态网络. 对不同状态下静态网络、共表达网络, 采用 cytoscape 中 intersection 交集计算, 获得其不同状态下共同的作用靶点、静态网络相同边和共表达网络相同边, 并计算靶点、边重叠率.

(2) 疾病状态下共表达网络模块分析. 蛋白质通过彼此之间相互作用结合成一个团体来完成其生物学功能, 这些紧密联系的团体称之为蛋白-蛋白复

合体或功能模块^[24]. 本研究基于 FAG-EC 算法对不同状态下共表达网络进行模块分析. FAG-EC^[25]是一种基于边聚类系数的快速层次聚类算法, 其中决定识别出模块大小的参数 ComplexSize Threshold 设置为 4, 即识别出的模块至少包含 4 条边. 利用 Cytoscape 中的 BinGO 插件^[26]对识别出的模块进行 GO 富集分析, 其中显著性选择 0.05, 基因本位信息及注释信息均来自 Gene ontology(<http://www.geneontology.org/>).

(3) 不同状态下功能模块对比分析. 提取疾病状态下获得的功能模块中的靶点蛋白, 将其映射到正常状态下的 CePIN, 得到正常状态下与疾病状态相对应的功能模块. 并对不同状态的功能模块进行 hub 节点对比分析, 揭示不同状态之间的动态变化信息. 节点的度(degree), 即与节点直接连接的边的数目, 也是与该节点建立连接的节点的数目. 在生物网络中, 节点度越高, 则更可能是网络调控的关键节点, 从而在网络调节中起到关键作用, 故将节点度高的节点称为 hub 节点^[27]. 本研究选取在网络中节点度最大且大于 1 的节点为 hub 节点.

2 结果与分析

2.1 化合物对应靶点信息

丹酚酸 B 从 ChEMBL 数据库中获得 5 个作用靶点; 在 STITCH 数据库中未检索到打分值>0.7 的靶点; 基于药效团虚拟筛选获得 20 个作用靶点. 丹酚酸 B 作用靶点信息见表 1.

2.2 共表达蛋白相互作用网络构建

丹酚酸 B 的静态蛋白互作网络, 包含 351 个节点和 2013 条边(图 1A). 丹酚酸 B non-CAD CePIN 包含 207 个节点和 247 条边, CAD CePIN 包含 233 个节点和 286 条边(图 1B1 和 B2).

2.3 共表达网络分析

(1) 不同状态下 CePIN 结构对比分析. 对不同状态下的 CePIN 进行结构分析(表 2). 尽管不同状态下的共表达蛋白相互作用中包含的相同蛋白重叠率达 73%, 但 CePPIs 重叠率仅为 27%, 暗示着在两种状态之间大部分的相互作用发生了结构重构; 同时静态与共表达蛋白相互作用之间也存在一定差异,

表 1 丹酚酸 B 作用靶点信息

uniprot ID	靶点名称	靶点来源
P06239	LCK	ChEMBL
P12931	SRC	ChEMBL
P42224	STAT1	ChEMBL
P51692	STAT5B	ChEMBL
P40763	STAT3	ChEMBL
P03372	ESR1	药效团
P24941	CDK2	药效团
Q00535	CDK5	药效团
P05164	MPO	药效团
P18031	PTPN1	药效团
P08684	CYP3A4	药效团
O75469	NR1I2	药效团
P00734	F2	药效团
P15056	BRAF	药效团
P12821	ACE	药效团
P09917	ALOX5	药效团
P35354	PTGS2	药效团
Q9UHC9	NPC1L1	药效团
P30556	AGTR1	药效团
P24530	EDNRB	药效团
P25101	EDNRA	药效团
P29466	CASP1	药效团
P55157	MTTP	药效团
P08235	NR3C2	药效团
P04035	HMGCR	药效团

表 2 疾病和正常状态下共表达网络结构信息

	蛋白	PPIs	CePPIs
疾病	233	1145	286
正常	207	1069	247
重叠	161	574	73
比率	73%	52%	27%

因此, CePIN 可以揭示隐藏在静态网络中特定状态下的动态信息.

(2) 疾病状态下共表达网络模块分析. 通过对疾病状态下的 CePIN 进行功能模块对比分析, 获得 18 个功能模块(图 2), 每个模块参与的主要生物过程见表 3.

模块 1, 5, 8, 9, 12, 18 主要与调节免疫/炎症反应有关, 主要包括靶点 26S 蛋白酶体非 ATP 酶调控剂亚基 10(26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 10, PSMD10)、蛋白酪氨酸磷酸酶受体型 C(receptor-type tyrosine-protein phosphatase C, PTPRC)、前列腺素内过氧化物酶 2(prostaglandin G/H synthase 2, PTGS2)、白细胞介素 6(interleukin-6, IL6)、

白细胞介素 1 β (interleukin-1 β , IL1 β)、PYD 结构域蛋白 3(NACHT, LRR and PYD domains-containing protein 3, NLRP3)等. PSMD10 是蛋白酶体的一员, 而蛋白酶体是形成泛素-蛋白酶体系统(ubiquitin-proteasome system, USP)的重要组成部分^[28]. USP 参与炎症反应, 归因于蛋白酶体能够激活 NF- κ B, 进而调控促炎性细胞因子(TNF- α , IL- β , IL-8)、黏附因子和 NO 表达^[29]. PTPRC 是蛋白酪氨酸磷酸酶家族(protein tyrosine phosphatase, PTP)成员, 是 T 细胞和 B 细胞抗原受体信号重要调节因子, 已被证明参与免疫反应^[30]. PTGS2 在大多数细胞正常状态下不表达, 在炎症过程中水平升高. PTGS2 是血栓素 A2 的重要前体, PTGS2 的低剂量抑制, 可抑制血栓素 A2 (thromboxane A2 receptor, TXA2)产生, 阻碍血小板聚集, 有助于预防心脏疾病^[31]. IL6, IL1 β 为促炎性细胞因子, 是炎症反应的重要调节因子. NLRP3 的激发

可导致 IL1 β 的产生^[32,33]并参与炎症和免疫反应. Rosenfeld^[34]研究表明, 机体免疫/炎症能够引起血液中巨噬细胞和白细胞的活化及凋亡, 参与白细胞黏附到血管内皮形成血斑和血小板凝集形成血栓等生理过程, 这些过程都与冠心病的发病机制密切相关^[35]. 而丹酚酸 B 可通过调节免疫/炎症过程来调节心血管疾病^[36]. 因此, 推断丹酚酸 B 可通过调节炎症反应治疗冠心病.

模块 3 和 16 生物过程主要与凝血调节有关, 主要包括血栓素受体(thromboxane A2 receptor, TBXA2R)、凝血因子 2 受体(proteinase-activated receptor 1, F2R)、原癌基因 vav 蛋白(Proto-oncogene vav, VAV1)、鸟苷三磷酸水解酶(GTPases)Rho 家族成员(Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1, RAC1)等. TBXA2R 已被证明参与血栓形成、免疫反应、急性心肌梗死等过程^[37]. 血栓素受体抑制剂被认为是抗

图1 丹酚酸 B 蛋白相互作用网络

节点为靶点蛋白, 边表示蛋白-蛋白相互作用. A: 静态蛋白相互作用网络; B1: 正常状态下共表达蛋白相互作用网络; B2: 疾病状态下共表达蛋白相互作用网络

血栓的潜在药物^[38]. F2R 是一种 G 蛋白偶联受体, 参与血栓形成反应调节^[39]. VAV1 是鸟嘌呤核苷酸交换因子 Db1 家族成员, 对造血具有重要作用. VAV1 有助于胶原相关肽和凝血酶诱导血小板凝集, VAV1 的缺失能够抑制血小板凝集^[40]. RAC1 参与调节糖蛋白 Ib-IX(platelet glycoprotein Ib beta chain, GPIb-IX)诱导的血小板活化信号转导机制, RAC1 的缺失能够阻碍 TXA2 的生成和血小板凝集^[41]. 李伟等人^[42]研究证明,

丹酚酸 B 可降低体外凝血酶诱导的血小板凝集率以及活化产物可溶性 P 选择素和可溶性 CD40L 的释放, 具有阻抑血小板活化、聚集与释放的作用. 因此, 推测丹酚酸 B 可能通过调节 TBXA2R, F2R, VAV1, RAC1 蛋白发挥凝血调节过程.

模块 6 主要与调节血液循环有关, 主要包括高分子量激肽酶(kininogen-1, KNG1)、内皮素受体 B(endothelin B receptor, EDNRB)、钙感受体

图 2 丹酚酸 B 疾病状态下获得的功能模块

表 3 模块参与的主要的生物过程^{a)}

模块	<i>P</i>	模块参与的生物过程
1	2.29×10^{-21}	免疫调节
2	1.66×10^{-11}	细胞代谢过程调节
3	3.40×10^{-9}	凝血
4	4.17×10^{-9}	细胞周期调控
5	5.57×10^{-11}	急性炎症反应调节
6	4.40×10^{-8}	血液循环
7	7.85×10^{-13}	蛋白质代谢过程
8	1.76×10^{-8}	免疫调节
9	3.40×10^{-7}	免疫调节
10	9.88×10^{-10}	花生四烯酸代谢过程
11	1.59×10^{-8}	成纤维细胞生长因子受体信号传导途径
12	5.09×10^{-6}	I- κ B 的激酶/NF- κ B 信号调控
13	1.42×10^{-6}	肾素-血管紧张素调节血容量
14	2.71×10^{-5}	脂质代谢
15	4.70×10^{-4}	脂质代谢
16	3.56×10^{-5}	凝血
17	1.93×10^{-4}	脂质代谢
18	1.32×10^{-4}	免疫调节

a) *P* 指的是模块中的基因参与某生物过程的概率, *P* 越小说明所得结果越具有统计学意义

(extracellular calcium-sensing receptor, CASR)、碱乙酰胆碱受体 M3(muscarinic acetylcholine receptor M3, CHRM3)等。KNG1 是一种循环血浆蛋白, KNG1 的激活可通过激肽释放酶-激肽系统促进产生血管扩张剂血管舒缓激肽^[43]。已有研究证明, 内皮素 1(ET-1)通过 EDNRB 受体产生血管舒张作用, 增强一氧化氮合酶活性, 促进 NO 释放^[44]。CASR 为 G 蛋白偶联受体 C 家族成员。细胞外钙激活 CASR, 通过抑制肾脏肾素-血管紧张素系统的激活, 减少甲状旁腺分泌甲状旁腺高血压因子, 促使血管周围神经产生神经源性超极化血管舒张因子-大麻素, 激活内皮细胞钙依赖性钾通道使血管平滑肌细胞产生内皮依赖性超极化而发生血管舒张^[45]。CHRM3 为 G 蛋白偶联受体。激活 CHRM3 可导致内皮依赖性舒张因子即一氧化氮释放, 引起邻近平滑肌细胞松弛, 从而扩张血管^[46]。田霞^[47]研究显示, 丹酚酸 B 镁具有抑制血管收缩效用。因此, 推测丹酚酸 B 可能通过调节血管舒张, 改善血液循环, 从而治疗冠心病。

模块 10 主要与调节花生四烯酸代谢有关, 主要包括胞浆磷脂酶 A2(cytosolic phospholipase A2, PLA2G4A)、5-脂氧合酶激活蛋白(arachidonate 5-lipoxygenase-activating protein, ALOX5AP)、5-脂氧合酶(arachidonate 5-lipoxygenase, ALOX5)等。花生

四烯酸(arachidonic acid, AA)在生物体内主要是以磷脂的形式存在于细胞膜上, 在 PLA2G4A 的作用下分解成游离的 AA。AA 的释放受 PLA2G4A 的调节。游离的 AA 被 ALOX5 氧化, 在 ALOX5AP 的辅助下, 生成不稳定的白三烯 A4(leukotriene A-4 hydrolase, LTA4), 继而 LTA4 被 LTA4H 水解成白三烯 B4(leukotriene B4, LTB4)^[48,49]。其中, ALOX5 在冠心病治疗中是药物干预靶点^[50]。LTB4 在 AS 斑块中表达异常丰富, 可上调单核/巨噬细胞膜表面氧化低密度脂蛋白受体 CD36 的表达, 促进单核/巨噬细胞转化为泡沫细胞, 促进脂质堆积, 参与 AS 斑块的形成和发展^[51]。花生四烯酸(AA)及其代谢衍生物具有很强的生物活性, 对人体心血管系统及免疫系统具有十分重要的作用。已有研究表明, 花生四烯酸代谢产物在动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)形成过程中发挥着重要作用^[48]。王丽等人^[52]调查显示, 丹酚酸 B 通过促进巨噬细胞胆固醇或脂质的外排, 发挥抗动脉粥样硬化作用, 而该作用依赖于 CD36。因此, 提示丹酚酸 B 可通过调节花生四烯酸代谢治疗冠心病。

模块 11 主要与调节成纤维细胞生长因子受体信号传导有关, 主要包括成纤维细胞生长因子 1(fibroblast growth factor 1, FGF1)、成纤维细胞生长因子 2(FGF2)、PAC-丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶(RAC-alpha serine/threonine-protein kinase, AKT1)等。FGFs 在细胞和组织增殖分化过程中发挥关键作用。其中, FGF1 和 FGF2 的重要功能之一是促进内皮细胞增殖和内皮细胞物理组织成管样结构。因此, 促进血管生成、新生血管的生长^[53]。FGF1 已在临床实验研究证明能够诱导心脏血管形成^[54]。FGF2 也称为碱性成纤维细胞生长因子, 在初步的动物研究中已被证明, 通过减少组织死亡和促进改善后再灌注后的功能, 保护心脏免受与心脏病发作相关损伤^[55]。同时, FGF2 被认为是病灶形成促进因子, 近年研究发现, 其与动脉粥样硬化和冠心病有关, 动物研究发现兔动脉粥样硬化模型中动脉壁 FGF2 表达水平比对照组显著升高^[56]。研究报道, 冠心病患者的血清 FGF2 浓度较正常人升高^[57]。且 FGF2 可通过激活 PI3K/AKT1 信号系统, 上调内皮型一氧化氮合酶(nitric oxide synthase, eNOS)蛋白的表达, 诱导血管内皮细胞 NO 的生成^[58], 而丹酚酸 B 可通过抗氧化作用阻止内皮损伤, 防止动脉粥样硬化^[1]。因此, 推断丹酚酸 B 可通过调节成纤维细胞生长因子受体信号系统治疗冠心病。

模块 13 主要与肾素-血管紧张素调节血容量有关, 主要包括血管紧张素转化酶(angiotensin-converting enzyme, ACE)和肾素(renin, REN)等. REN 在 ACE 的作用下依次转化成血管紧张素 I、血管紧张素 II^[59]. 血管紧张素 II 可收缩血管, 增加 ADH 和醛固酮的分泌, 刺激下丘脑激活的口渴反射, 导致血压升高^[60]. ACE 和 REN 参与肾素-血管紧张素系统(renin-angiotensin system, RAS), 通过调节血容量来控制血压^[61]. 高血压是冠心病独立危险因素. 已有研究证明, 丹酚酸 B 对原发性高血压大鼠(*Rattus norvegicus*)具有一定的降压作用, 其机制可能与调节 RAS、血清 ANF、TG 水平及抗氧化作用有关^[62]. 因此, 推断丹酚酸 B 可通过调节 RAS 系统治疗冠心病.

模块 14, 15, 17 主要与调控脂质代谢有关, 主要包括过氧化物酶体增殖物激活受体(peroxisome proliferator-activated receptor gamma, PPARG)、核受体辅抑制物 1(nuclear receptor corepressor 1, NCOR1)、糖皮质激素受体(glucocorticoid receptor, NR3C1)、细胞色素 P450 3A4(cytochrome P450 3A4, CYP3A4)和磷脂酶 A2(phospholipase A2, PLA2)系列蛋白等. PPARG 为脂肪细胞分化调节因子, 该蛋白激活能够刺激脂肪细胞脂质摄取和脂肪形成^[63]. 已有

研究证明, PPARG 与其激动剂 LT175 的相互作用可影响 NCOR1 的形成, 继而调节脂代谢^[64]. 目前, PPARG 的激动剂已用于高脂血症和高血糖的治疗^[65]. NR3C1 是一种类固醇激素受体, 在调节糖和脂质代谢中发挥重要作用^[66]. CYP3A4 为细胞色素 P450 酶, 参与催化胆固醇、类固醇和其他脂类成分的合成反应. 25-羟基胆固醇是一种脂质代谢潜在调节因子, Honda 等人^[67]调查表明, CYP3A 对 25-羟基胆固醇产生具有重要意义. PLA2 为冠心病危险性标志^[68]. 其中, PLA2G10(组 10 磷脂酶 A2)能够通过促进动脉粥样硬化低密度脂蛋白形成增强泡沫细胞的形成^[61]. PLA2G1B(组 1B 磷脂酶 A2)在调节脂代谢中发挥作用, PLA2G1B 的缺失可以保护高脂血症. 抑制 PLA2G1B 可降低极低密度脂蛋白(very low density lipoprotein, VLDL)和甘油三酯(triglyceride, TG)的产生^[69]. 因此, 推断丹酚酸 B 可通过调节脂质代谢治疗冠心病.

此外, 模块 2, 4, 7 分别主要与细胞代谢、细胞周期、蛋白质代谢有关, 这些模块主要体现了细胞的基础代谢过程.

(3) 不同状态下功能模块的对比分析. 本文利用 cytoHubba 软件中基于度方法的计算, 获得不同状态下相应功能模块的 hub 节点(图 3). 度方法公式为:

图 3 功能模块在不同状态下 hub 节点变化

图中节点为靶点蛋白, 边表示蛋白-蛋白相互作用. 灰色节点为 hub 节点, 虚线的节点表示在正常状态下共表达网络中不存在的蛋白

$$Deg(v)=N(v),$$

其中, $Deg(v)$ 表示节点 v 的度, $N(v)$ 表示和 v 节点相关联的边的条数。

从图 3 可以发现, 丹酚酸 B 治疗冠心病功能模块在正常状态下的节点度远小于疾病状态下的节点度, 功能模块在不同状态下的 hub 节点大部分都发生了变化, 表明模块中所含有的蛋白在疾病状态下发挥关键作用。如模块 5 中, 正常状态下的 hub 节点为 JUN 和 IL1B, 疾病状态下的 hub 节点为 JUN。虽然都含有 hub 节点 JUN, 但 JUN 在疾病状态的节点度为 5, 大于在正常状态的节点度 4。通过对不同状态下的相应功能模块网络结构对比分析发现, 各功能模块的网络结构都发生了重构, 说明网络结构的重构是造成功能模块在不同状态下节点度和 hub 节点发生变化的原因; 同时也揭示了模块中蛋白在不同状态下相互作用的动态变化。

3 结论

本研究通过整合丹酚酸 B 静态蛋白相互作用网络和冠心病基因表达谱分别构建疾病和正常状态下 CePIN, 且对疾病状态下的 CePIN 进行模块分析和功能注释。通过对不同状态下的 CePIN 进行结构分析和功能模块分析, 揭示隐藏在静态网络中的特定状态下的动态信息, 从而探讨了功能模块动态变化信息。研究结果显示, 丹酚酸 B 主要通过调节免疫/炎症反应、凝血、血液循环、花生四烯酸代谢、成纤维细胞生长因子受体信号传导途径、肾素-血管紧张素系统、脂质代谢以及基础代谢等途径达到治疗冠心病的效果。该研究从分子网络水平上探讨丹酚酸 B 治疗冠心病的作用机制, 为其临床应用提供科学依据。

参考文献

- 1 李霁, 王阶, 王师菡, 等. 丹酚酸在冠心病中的研究概况与进展. 辽宁中医杂志, 2008, 35: 1788–1789
- 2 Lv H, Wang L, Shen J, et al. Salvianolic acid B attenuates apoptosis and inflammation via SIRT1 activation in experimental stroke rats. Brain Res Bull, 2015, 115: 30–36
- 3 Dai J P, Zhu D X, Sheng J T, et al. Inhibition of tanshinone IIA, salvianolic acid A and salvianolic acid B on areca nut extract-induced oral submucous fibrosis *in vitro*. Molecules, 2015, 20: 6794–6807
- 4 Wu Z, Li J N, Bai Z Q, et al. Antagonism by salvianolic acid B of lipopolysaccharide-induced disseminated intravascular coagulation in rabbits. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2014, 41: 502–508
- 5 He H B, Yang X Z, Shi M Q, et al. Comparison of cardioprotective effects of salvianolic acid B and benazepril on large myocardial infarction in rats. Pharmacol Rep, 2008, 60: 369–381
- 6 Yokozawa T, Lee T W, Chung H Y, et al. Depressor effect of magnesium lithospermate B, a component of *Salviae Miltiorrhizae Radix*, in spontaneously hypertensive rats. Phytother Res, 1994, 8: 271–275
- 7 李湘平, 尹桃. 丹参多酚酸盐注射液治疗冠心病的疗效观察. 中国现代医学杂志, 2010, 20: 619–624
- 8 Zhang A D. Protein Interaction Networks: Computational Analysis. Cambridge: Cambridge University Press, 2009
- 9 D'Haeseleer P, Church G M. Estimating and improving protein interaction error rates. Proc IEEE Comput Syst Bioinform Conf, 2004. 216–223
- 10 Singhal M, Domico K. CABIN: collective analysis of biological interaction networks. Comput Biol Chem, 2003, 31: 222–225
- 11 Camargo A., Azuaje F. Identification of dilated cardiomyopathy signature genes through gene expression and network data integration. Genomics, 2008, 92: 404–413
- 12 Cline M S, Smoot M, Cerami E, et al. Integration of biological networks and gene expression data using Cytoscape. Nat Protoc, 2007, 2: 2366–2382
- 13 Taylor I W, Linding R, Warde-Farley D, et al. Dynamic modularity in protein interaction networks predicts breast cancer outcome. Nat Biotechnol, 2009, 27: 199–204
- 14 Cheng T M, Gulati S, Agius R, et al. Understanding cancer mechanisms through network dynamics. Brief Funct Genomics, 2012, 11: 543–560
- 15 Gaulton A, Bellis L J, Bento A P, et al. ChEMBL: a large-scale bioactivity database for drug discovery. Nucleic Acids Res, 2012, 40: D1100–D1107
- 16 Michael K, Damian S, Sune P F, et al. STITCH 4: integration of protein-chemical interactions with user data. Nucleic Acids Res, 2014,

42: D401–D407

- 17 任真真, 张燕玲, 王星, 等. 三七皂苷类成分的蛋白质相互作用网络分析. 中国中药杂志, 2014, 39: 2097–2102
- 18 Wang X, Xiang Y H, Ren Z Z, et al. Rational questing for inhibitors of ECE-1 from *Salvia miltiorrhiza* by combining ligand and structure based virtual screening. *Can J Chem*, 2013, 91: 448–456
- 19 Wang X, Ren Z Z, He Y S, et al. A combination of pharmacophore modeling, molecular docking and virtual screening for iNOS inhibitors from Chinese herbs. *Bio-Med Mater Eng*, 2014, 24: 1315–1312
- 20 Franceschini A, Szklarczyk D, Frankild S, et al. STRING v9.1: protein-protein interaction networks, with increased coverage and integration. *Nucleic Acids Res*, 2013, 41: D808–D815
- 21 Shannon P, Markiel A, Ozier O, et al. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Res*, 2003, 13: 2498–2504
- 22 Assenov Y, Ramirez F, Schelhorn SE, et al. Computing topological parameters of biological networks. *Bioinformatics*, 2008, 24: 282–284
- 23 余海浪, 马文丽, 郑文岭. 用于基因数据挖掘的基因表达数据库 GEO. 中国生物工程杂志, 2007, 27: 96–103
- 24 Bader G D, Hogue C W. Analyzing yeast protein-protein interaction data obtained from different sources. *Nat Biotechnol*, 2002, 20: 991–997
- 25 Jon B, Bala V, Jianxin W, et al. Evidence for non-thermal microwave effects using single and multimode hybrid conventional/microwave systems. *J Microw Power Electromagn Energy*, 2008, 42: 47–63
- 26 Maere S, Kuiper H M. BiNGO: a Cytoscape plugin to assess overrepresentation of Gene Ontology categories in Biological Networks. *Bioinformatics*, 2005, 21: 3448–3449
- 27 Tsai C J, Ma B, Nussinov R. Protein-protein interaction networks: how can a hub protein bind so many different partners? *Trends Biochem Sci*, 2009, 34: 594–600
- 28 Kleiger G, Mayor T. Perilous journey: a tour of the ubiquitin-proteasome system. *Trends Cell Biol*, 2014, 24: 352–359
- 29 Karin M, Delhase M. The I kappa B kinase (IKK) and NF-kappa B: key elements of proinflammatory signalling. *Semin Immunol*, 2000, 12: 85–98
- 30 Huntington N D, Tarlinton D M. CD45: direct and indirect government of immune regulation. *Immunol Lett*, 2004, 94: 167–174
- 31 Lordkipanidzé M, Pharand C, Schampaert E, et al. A comparison of six major platelet function tests to determine the prevalence of aspirin resistance in patients with stable coronary artery disease. *Eur Heart J*, 2007, 28: 1702–1708
- 32 Hari A, Zhang Y, Tu Z, et al. Activation of NLRP3 inflammasome by crystalline structures via cell surface contact. *Sci Rep*, 2014, 2: 7281–7281
- 33 Masters S L, Simon A, Aksentijevich I, et al. Horror autinflammaticus: the molecular pathophysiology of autoinflammatory disease. *Annu Rev Immunol*, 2009, 27: 621–668
- 34 Rosenfeld M E. Cellular mechanisms in the development of atherosclerosis. *Diabetes Res Clin Pract*, 1996, 30: 1–11
- 35 洪永敦, 黄衍寿, 吴辉, 等. 冠心病中医证候与炎症因子关系的临床研究. 广州中医药大学学报, 2005, 2: 81–86
- 36 叶立, 何园, 叶浩, 等. 基于通路关联网络研究丹酚酸 B 治疗心血管疾病的机理. 科学通报, 2012, 57: 1019–1027
- 37 Huang J S, Ramamurthy S K, Lin X, et al. Cell signalling through thromboxane A2 receptors. *Cell Signal*, 2004, 16: 521–533
- 38 Shen R F, Tai H H. Thromboxanes: synthase and receptors. *J Biomed Sci*, 1998, 5: 153–172
- 39 Leger A J, Covic L, Kuliopulos A. Protease-activated receptors in cardiovascular diseases. *Circulation*, 2006, 114: 1070–1077
- 40 Pearce A C, Wilde J I, Doody G M, et al. Vav1, but not Vav2, contributes to platelet aggregation by CRP and thrombin, but neither is required for regulation of phospholipase C. *Blood*, 2002, 100: 3561–3569
- 41 Aslan J E, Mccarty O J T. Regulation of the mTOR-Rac1 axis in platelet function. *Small Gtpases*, 2012, 3: 67–0
- 42 李伟, 张军平, 徐士欣, 等. 丹酚酸 B 对血小板聚集及释放 sP-sel 和 sCD40L 的影响. 中华中医药学刊, 2013, 31: 48–50
- 43 Sakurai H, Maeda M, Murase M, et al. Hemofiltration removes bradykinin generated in the priming blood in cardiopulmonary bypass during circulation. *Ann Thorac Cardiovasc Surg*, 1998, 4: 59–63
- 44 韩宝石, 盖鲁. 心血管系统内皮素 B 型受体研究进展. 医学综述, 2008, 14: 1799–1801
- 45 Sanela S, Jacob T H. Novel role of the calcium-sensing receptor in blood pressure modulation. *Hypertension*, 2008, 52: 994–1000
- 46 Keith P, Laurence B, Goodman L S, et al. Goodman & Gilman's the Pharmacological Basis of Therapeutics. 11th ed. New York: McGraw-Hill, 2006. 185
- 47 田霞. 丹酚酸 B 镁对血管收缩的作用以及抑制激动剂诱导平滑肌细胞内钙升高的药理学机制研究. 硕士学位论文. 上海: 中国科学院研究生院(上海生命科学研究院), 2005

- 48 郭歌, 祖凌云, 高炜. 花生四烯酸代谢产物与动脉粥样硬化. 心血管病学进展, 2014, 35: 526–530
- 49 Peters G M, Brock T G. 5-lipoxygenase and FLAP. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 2003, 69: 99–109
- 50 Powell W S, Rokach J. The eosinophil chemoattractant 5-oxo-EET and the OXE receptor. Prog Lipid Res, 2013, 52: 651–655
- 51 Jala V R, Haribabu B. Leukotrienes and atherosclerosis: new roles for old mediators. Trends Immunol, 2004, 25: 315–322
- 52 王丽, 姜华军, 杨帆, 等. 丹酚酸 B 在巨噬细胞胆固醇外排中的作用. 中国医药生物技术, 2013, 8: 100–106
- 53 Cao R, Bråkenhielm E, Pawliuk R, et al. Angiogenic synergism, vascular stability and improvement of hind-limb ischemia by a combination of PDGF-BB and FGF-2. Nat Med, 2003, 9: 604–613
- 54 Stegmann T J. New approaches to coronary heart disease: induction of neovascularisation by growth factors. BioDrugs, 1999, 11: 301–308
- 55 House S L, Bolte C, Zhou M, et al. Cardiac-specific overexpression of fibroblast growth factor-2 protects against myocardial dysfunction and infarction in a murine model of low-flow ischemia. Circulation, 2003, 108: 3140–3148
- 56 唐靖一, 薛金贵, 胡婉美, 等. 卡托普利对兔动脉粥样硬化斑块内碱性成纤维细胞生长因子和血管内皮生长因子的影响. 中国心血管杂志, 2004, 9: 4–8
- 57 Hasdai D, Barak V, Leibovitz E, et al. Serumbasic fibroblast growth factor levels in patients with ischemic heart disease. Int J Cardiol, 1997, 59: 133–138
- 58 Mata-Greenwood E, Liao W X, Zheng J, et al. Differential activation of multiple signaling pathways dictates eNOS upregulation by FGF2 but not VEGF in placental artery endothelial cells. Placenta, 2008, 29: 708–717
- 59 Basso N, Terragno N A. History about the discovery of the renin-angiotensin system. Hypertension, 2001, 38: 1246–1249
- 60 Zhang R, Xu X, Chen T, et al. An assay for angiotensin-converting enzyme using capillary zone electrophoresis. Anal Biochem, 2000, 280: 286–290
- 61 Yee A H, Burns J D, Wijdicks E F. Cerebral salt wasting: pathophysiology, diagnosis, and treatment. Neurosurg Clin N Am, 2010, 21: 339–352
- 62 周才杰, 刘江琦, 高晗, 等. 丹酚酸 B 对原发性高血压大鼠的降压作用机制研究. 中药新药与临床药理, 2013, 24: 374–379
- 63 Jones J R, Barrick C, Kim K A, et al. Deletion of PPAR γ in adipose tissues of mice protects against high fat diet-induced obesity and insulin resistance. Proc Natl Acad Sci USA, 2005, 102: 6207–6212
- 64 Federica G, Marco G, Nico M, et al. LT175 is a novel PPAR α/γ ligand with potent insulin sensitizing effects and reduced adipogenic properties. J Biol Chem, 2014, 289: 6908–6920
- 65 Li Y, Qi Y, Huang T H, et al. Pomegranate flower: a unique traditional antidiabetic medicine with dual PPAR- α - γ activator properties. Diabetes Obes Metab, 2008, 10: 10–17
- 66 Xu H E, Xu Y, He Y. Methods of using substituted isoxazolo pyridinones as dissociated glucocorticoids. USA Patent, US8173670, 2012
- 67 Honda A, Miyazaki T, Ikegami T, et al. Cholesterol 25-hydroxylation activity of CYP3A. J Lipid Res, 2011, 52: 1509–1516
- 68 Guardiola M, Exeter H J, Perret C, et al. PLA2G10 gene variants, sPLA2 activity, and coronary heart disease risk. Circ Cardiovasc Genet, 2015, 8: 356–362
- 69 Hollie N I, Konanah E S, Goodin C, et al. Group 1B phospholipase A2 inactivation suppresses atherosclerosis and metabolic diseases in LDL receptor-deficient mice. Atherosclerosis, 2014, 234: 377–380

Mechanism of salvianolic acid B treating coronary artery disease based on dynamic network modules

ZHENG ShiChao, HUO MengQi, ZHANG YanLing & QIAO YanJiang

Key Laboratory of TCM Foundation and New Drug Research, School of Chinese Material Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China

Salvianolic acid B (Sal B) is one of the main active components of *Salvia miltiorrhiza*, which has good effect on treating coronary artery disease (CAD). However, the mechanism of Sal B treating the CAD has not been illuminated clearly. Therefore, the construction and analysis of dynamic network modules was used to elucidate the mechanism, which has the advantage of revealing the dynamics of protein interaction network in the paper. Firstly, the targets' information of Sal B was obtained from pharmacophore screening and database searching (STITCH & ChEMBL). Secondly, the protein-protein interaction (PPI) of targets was achieved from STRING, and the protein interaction network (PIN), also called the static PIN, was constructed by Cytoscape. Then, the co-expression PIN (CePIN) was constructed by integrating the static PIN with the gene expression profile of CAD from GEO which contains normal and disease condition samples. The Co-PIN consists of co-expression PPIs which are significantly expressed PPIs in the CAD gene expression profile. Next, the modules of CePIN in disease condition were analyzed based on FAG-EC and GO enrichment. Finally, the modules in disease condition were mapped to the normal condition, and the comparative analysis of modules in different condition revealed the dynamic information of different biological condition. Meanwhile, based on the analysis of the modules in disease condition, the mechanism of Sal B treating CAD was related to the regulation of immune/inflammation response, coagulation, blood circulation, arachidonic acid metabolism, fibroblast growth factor receptor signaling pathway, the renin-angiotensin system, lipid metabolism and basic metabolism.

salvianolic acid B, coronary artery disease, dynamics, function modules, mechanism

doi: 10.1360/N052016-00020