

网络出版时间:2023-05-10 10:24:21 网络出版地址:https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1086.R.20230508.1431.050.html

基于网络药理学和分子对接探讨人参-红景天治疗 心肌缺血/再灌注损伤的作用机制

赵倩琳¹, 赖颖蓉¹, 姜丽红²

(1. 长春中医药大学中医学院, 吉林 长春 130117; 2. 长春中医药大学附属医院, 吉林 长春 130021)

doi:10.12360/CPB202203035

文献标志码:A 文章编号:1001-1978(2023)05-0970-09

中国图书分类号:R282.71;R319;R364.5;R349.1;R542.2

摘要:目的 采用网络药理学方法、分子对接技术及实验研究,探究人参-红景天治疗心肌缺血/再灌注损伤(myocardial ischemia-reperfusion injury, MIRI)的作用靶点及机制。方法 通过TCMSP数据库及文献补充筛选人参-红景天的有效活性成分及靶点,检索GENECARDS、DISGENET、DRUG-BANK数据库得到MIRI靶点,使用STRING数据库构造功能蛋白相互作用网络(PPI),筛出核心靶点;并选择DAVID数据库进行基因本体功能分析(GO)和KEGG信号通路富集分析;最后借助分子对接技术及实验研究进行初步验证。结果

获得人参-红景天有效活性成分43种,潜在靶点348个,并发现IL-6、TNF- α 、VEGFA等靶点与MIRI密切相关,主要涉及TNF、PI3K-Akt、HIF-1等信号通路。分子对接结果显示,豆甾醇、人参皂苷rh2及红景天苷与IL-6、TNF- α 、Caspase-3等靶点均有较好的结合作用且匹配度高,其中结合性最好的是Caspase-3与人参皂苷rh2,实验研究结果显示,人参-红景天可改善MIRI后心肌组织坏死,减轻心肌细胞水肿及血管充血情况,并降低MIRI大鼠中TNF- α 及IL-6的表达水平。结论 人参-红景天可能通过豆甾醇、人参皂苷rh2及红景天苷来调控IL-6、TNF- α 、Caspase-3等多个靶点,抑制炎症及氧化应激反应,减轻心肌细胞损伤,发挥对MIRI的治疗作用。

关键词:人参-红景天;心肌缺血/再灌注损伤;网络药理学;分子对接;核心靶点;信号通路

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



收稿日期:2022-12-11,修回日期:2023-03-26

基金项目:国家自然科学基金面上项目(No 81673846);吉林省科技厅发展计划项目(No 20200201320JC)

作者简介:赵倩琳(1994-),女,硕士生,研究方向:中医药防治心血管疾病,E-mail:573982499@qq.com;

姜丽红(1965-),女,教授,博士生导师,主任医师,研究方向:中医药防治心血管疾病,通信作者,E-mail:jiangli-hong007@163.com

急性心肌梗死是导致心脏病患者发病和死亡的重要原因之一,发生心梗时可通过经皮冠状动脉介入术治疗再通堵塞的冠状动脉,但恢复冠脉血流过程中反而会加重心肌损伤,即为心肌缺血/再灌注损伤(myocardial ischemia-reperfusion injury, MIRI)^[1],现代医学对其发病机制暂无明确定论,有研究认为与细胞凋亡、细胞内钙离子超载及氧自由基的作用等有关。当心肌组织缺氧缺血时,线粒体代谢功能异常及心肌细胞膜受损,使内膜形成斑块,导致心肌梗死面积增大,大量氧自由基及炎症因子释放,加重心肌组织损伤。目前减轻MIRI的用药包括他汀类药物、降压药、促红细胞生成素等^[2],这些药物虽能缓解MIRI患者的部分症状,但特异性差且副作用明显。近年来,中药因其活性成分及作用靶点丰富,作用途径多样,且疗效明显和副作用少等特点在心血管疾病的防治中受到关注。

MIRI的中医病机为心气虚损,心阳渐衰,并受到寒邪、七情内伤及饮食不节等因素影响,导致气虚血瘀,痰浊阻于心脉而致病。人参-红景天是参红通络方的君药药对,参红通络方是长春中医药大学附属医院心病科在本校已故国医大师任继学教授的“痰瘀伏邪”学说指导下创制的中药复方,对冠心病和急性心梗患者PCI术后症状的疗效显著^[3],人参大补元气,益气养阴,气顺则血通,红景天益气活血化痰。据现代药理学研究发现,人参皂苷可抑制心肌肥大,使血管再生速度加快,减少心肌细胞凋亡,红景天苷促使钙离子回到肌浆网,缓解因钙离子超载引起的心肌损伤,减轻心肌缺血等^[4-5],人参-红景天是参红通络方产生显著疗效的核心,但其作用机制和涉及的生物过程目前尚不明确。

近几年,网络药理学的应用为中药的作用机制研究提供了方法和思路,它结合系统生物学、医学等多学科理论,使用计算机科学对生物系统进行网络数据分析,揭示了药物-活性成分-靶点-疾病之间互相作用网络,从而预测药物的作用机制,其系统性、综合性及整体性与中药的特点类似^[6]。本研究拟通过网络药理学方法分析人参-红景天治疗MI-

RI 潜在的作用靶点及机制,并通过分子对接技术和实验研究进行初步验证,为后续研究及临床应用提供理论基础。

1 方法

1.1 人参-红景天有效活性成分与靶点的收集与筛选 人参:在 TC MSP 数据库(<http://tcmsp.com/tcmsp.php>)中以“人参”为关键词搜索,将参数中的口服生物利用度(oral bioavailability, OB)阈值及类药性阈值(drug-likeness, DL)设定为 $\geq 30\%$ 和 ≥ 0.18 ,得到人参的有效活性成分及蛋白靶点。

红景天:查阅红景天的相关文献^[7-9],整合后得到红景天有效活性成分,在 PubChem 数据库(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)检索,确定成分的 Canonical SMILES 结构(注:因部分成分 PubChem 数据库尚未记录,则根据其成分命名和相关文献得出可能性最大的 SMILES 结构),输入 Swiss Target Prediction 数据库(<http://www.swisstargetprediction.ch/index.php>),挑选可能性大于 10% 的作用靶点。使用 Uniprot 数据库(<https://www.uniprot.org/>),将“organisms”设置为“Human”,对人参和红景天的蛋白靶点进行 Gene Symbol 转换。

1.2 MIRI 靶点的筛选 在 GeneCards(<https://www.genecards.org/>)、Disgenet(<https://www.disgenet.org/home/>)及 DRUGBANK(<https://go.drugbank.com/>)数据库中以“Myocardial ischemia - reperfusion injury”为关键词搜索 MIRI 的蛋白靶点,合并以上 3 个疾病数据库结果并移除重复项后得到最终靶点。

1.3 药物与疾病共同靶点筛选 为明确人参-红景天的活性成分及其靶点与疾病之间的相互作用,使用 Venny2.1 软件(<https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/>)获得两者的交集靶点。

1.4 “药物-活性成分-靶点-疾病”网络构建 将人参-红景天的有效活性成分及对应的靶点和 MIRI 靶点输入 CytoScape3.7.2 软件,构造药物-成分-靶点-疾病网络,并借助 Network Analyzer 网络分析插件,关注节点的连接度值(Degree),度值大表示涉及的生物功能多,重要性比较高。

1.5 人参-红景天与 MIRI 靶点 PPI 网络构建 把交集靶点导入 STRING11.0 数据库(<https://string-db.org/cgi/input.pl>),将物种选为“Homo sapiens”,最低交互阈值为“highest confidence ≥ 0.9 ”,得到蛋白相互作用网络(PPI)结果,用 CytoScape3.7.2 软件将 PPI 网络可视化,利用 MCODE 插件进一步分析,筛选出核心网络模块。

1.6 GO 基因功能与 KEGG 信号通路富集分析

在 DAVID 数据库(<https://david.ncifcrf.gov/tools.jsp>)中进行 GO 基因功能和 KEGG 信号通路富集分析,选择“Functional Annotation”功能,物种设为“Homo sapiens”,获取人参-红景天治疗 MIRI 的生物学过程与代谢通路数据,将所得数据导入“bioinformatics online tool”(<http://www.bioinformatics.com.cn>)制图,以气泡图形式呈现结果。

1.7 分子对接 在 PubChem 数据库(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)中下载人参-红景天活性成分的结构并转化为 mol2 格式保存,关键靶点蛋白来自于蛋白质数据库(<https://www.rcsb.org/>),将所得靶点蛋白导入 AutoDockTools-1.5.6 软件,删除水分子、添加氢原子并设置原子类型后,保存为 PDBQT 格式文件,通过 AutoDock4.2.6 进行分子对接,借助 Pymol2.1 软件对分子对接结果进行可视化。

1.8 动物实验

1.8.1 试验动物及药物 选择 28 只健康的 SD 大鼠,体质量为(220~250) g,购自北京维通利华实验动物公司,动物许可证号:SCXK(京)2016-0006,动物实验经长春中医药大学动物伦理委员会批准(编号:2021201)。人参与红景天颗粒剂购自长春中医药大学附属医院制剂中心,3-MA 抑制剂购自上海阿拉丁试剂公司。

1.8.2 试剂 TNF- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)试剂盒(202103)、IL-6 (interleukin-6, IL-6)试剂盒(202103)购自上海优选生物科技公司。

1.8.3 分组及给药 将大鼠随机分为假手术组、MIRI 模型组、人参-红景天组、3-MA 组,每组各 7 只。参红通络方中剂量为人参 9 g,红景天 10 g,按人与大鼠体表面积折算的等效剂量比值 0.018 及草药与浓缩颗粒浓度比换算后,给药剂量是人参 0.35 kg \cdot d⁻¹,红景天 0.39 kg \cdot d⁻¹,腹腔注射 3-MA,注射浓度为 15 mg \cdot kg⁻¹ \cdot d⁻¹,连续灌胃给药 28 d。

1.8.4 实验造模及取材 腹腔注射 5% 水合氯醛,麻醉固定大鼠,连接心电图,气管插管,连接小动物呼吸机,从左胸 4、5 肋间切开暴露心脏,用 6-0 缝合线结扎冠状动脉左前降支 30 min,左侧心肌壁紫绀,心尖变白,心电图示 II 导联 ST 段抬高 0.2 mV,再灌注 120 min 后,ST 段下降且紫绀消失即造模成功,假手术组仅穿线不结扎。结束后腹主动脉取血,4℃ 离心 10 min 后取血清保存,固定心脏组织。

1.8.5 HE 染色法观察大鼠心肌组织损伤情况 将固定后的心脏组织,脱水石蜡包埋切片,将切片依次放入二甲苯 I、II 及乙醇中,使用苏木精、伊红水

溶液进行染色,脱水封片,在光学显微镜(×400)下观察各组大鼠心肌组织的病理学情况。

1.8.6 ELISA 法测定大鼠 TNF-α 及 IL-6 的表达水平 按 ELISA 试剂盒说明书步骤,检测各组大鼠 TNF-α 及 IL-6 的表达水平。

1.8.7 统计学分析 使用 SPSS 22.0 软件分析所得数据,结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示,检验正态分布,两两比较用 *t* 检验,多组比较用单因素方差分析 (analysis of variance, ANOVA)。

2 结果

2.1 人参-红景天有效活性成分及靶点 人参-红景天有效活性成分共 43 种,见 Tab 1,作用靶点 944 个,将靶点经 Uniprot 数据库转换去重后得到人参作用靶点 90 个,红景天作用靶点 258 个,共 348 个。

2.2 MIRI 的疾病靶点筛选 将 Disgenet 数据库中 Score 设为 0.3,得到 MIRI 靶点 85 个;将 Genecards 数据库中设定 Relevance score > 20,得到 MIRI 靶点 173 个,结合 DRUGBANK 数据库补充 MIRI 相关靶点,合并以上 3 个数据库结果并删去重复值,获得 258 个 MIRI 蛋白靶点。

2.3 人参-红景天与 MIRI 交集靶点筛选 将人参-红景天的 348 个靶点和 MIRI 的 258 个靶点取交集并作图,见 Fig 1,得到红景天与 MIRI 的靶点 34 个,人参与 MIRI 的共有靶点 28 个,人参-红景天与 MIRI 的交集靶点共有 55 个,此为人参-红景天治疗 MIRI 的关键性蛋白靶点。

2.4 “药物-活性成分-靶点-疾病”网络 在“药物-活性成分-靶点-疾病”网络中,度值排名前 10 的有效活性成分为 hexacosanoic acid、p-

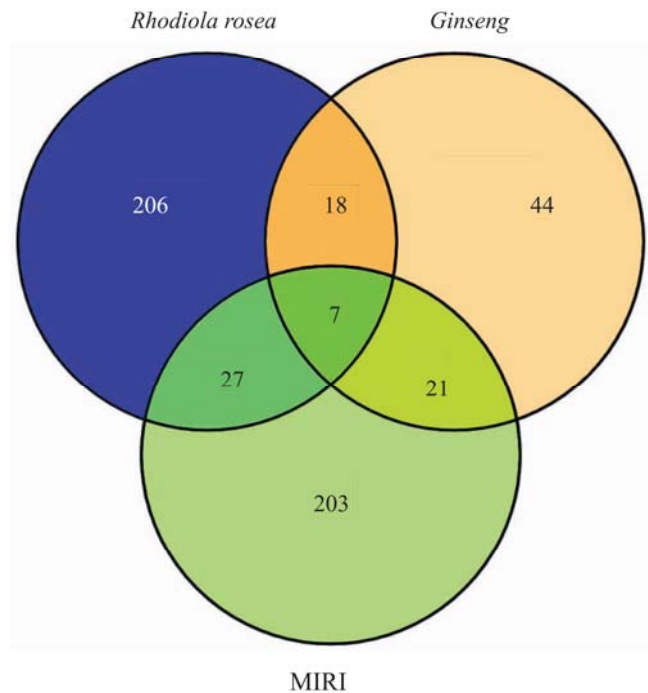


Fig 1 Ginseng-Rhodiola rosea and MIRI intersection targets

coumaric acid、stigmasterol、fumarine、stearic acid、caffeic acid、epicatechin gallate、beta-Sitosterol、ginsenoside rh2、salidroside,以上活性成分可能在人参-红景天治疗 MIRI 中起到关键性作用,因所获靶点较多,故以大于节点度值中位数 2 倍作为筛选条件,展示部分候选靶点,见 Tab 2。

2.5 人参-红景天与 MIRI 靶点的 PPI 网络图 PPI 网络中共有节点 73 个,见 Fig 2,节点连线越多表示其在蛋白调控中越重要,可视为 PPI 网络中的核心调控蛋白,该网络中蛋白互作频次排名前 11 的为 TNF-α、IL-6、VEGFA、MAPK1、CASPASE-3、PTGS2、TP53、JUN、TLR4、IL-10、MAPK8,见 Fig 3。

Tab 1 The active ingredients of Ginseng and Rhodiola rosea

Number	Molecule name	Number	Molecule name	Number	Molecule name
HJT1	Gallic acid	HJT15	Quercetin-3-O-glucuronide	RS2	Stigmasterol
HJT2	Protocatechuic acid	HJT16	Rhodionin	RS3	Inermin
HJT3	Salidroside	HJT17	Quercitrin	RS4	Aposiopolamine
HJT4	Tyrosol	HJT18	Eriodictyol	RS5	Deoxyharringtonine
HJT5	Caffeic acid	HJT19	Crenuloside	RS6	Dianthramine
HJT6	Procyanidin B2	HJT20	Quercetin	RS7	arachidonate
HJT7	p-coumaric acid	HJT21	Kenposide A	RS8	Frutinone A
HJT8	Ferulic acid	HJT22	Creoside V	RS9	Ginsenoside rh2
HJT9	Epicatechin gallate	HJT23	Eicosyl ferulate	RS10	Ginsenoside-Rh4_qt
HJT10	Catechin gallate	HJT24	beta-Sitosterol	RS11	Girinimbin
HJT11	1,2,3,4,6-O-Pentagalloyl glucopyranoside	HJT25	Hexacosanoic acid	RS12	Panaxadiol
HJT12	Afzelin	HJT26	Stearic acid	RS13	Suchilactone
HJT13	Quercetin-3-glucoside	HJT27	Nonadecane	RS14	Alexandrin_qt
HJT14	Rhodosin	RS1	Diop	RS15	Fumarine

Tab 2 Candidate target information

Uniprot ID	Symbol	Target name
P35354	PTGS2	Prostaglandin G/H synthase 2
P00918	CA2	Carbonic anhydrase 2
Q15596	NCOA2	Nuclear receptor coactivator 2
P00915	CA1	Carbonic anhydrase 1
P06401	PGR	Progesterone receptor
P42574	CASP3	Caspase-3
P19793	RXRA	Retinoic acid receptor RXR-alpha
P11229	CHRM1	Muscarinic acetylcholine receptor M1
P14780	MMP9	Matrix metalloproteinase-9
P03956	MMP1	Interstitial collagenase
P23975	SLC6A2	Sodium-dependent noradrenaline transporter
P35368	ADRA1B	Alpha-1B adrenergic receptor
P08253	MMP2	72 kDa type IV collagenase
P14867	GABRA1	Gamma-aminobutyric acid receptor subunit alpha-1
Q14524	SCN5A	Sodium channel protein type 5 subunit alpha
P07550	ADRB2	Beta-2 adrenergic receptor
P23219	PTGS1	Prostaglandin G/H synthase 1
P20309	CHRM3	Muscarinic acetylcholine receptor M3
P10275	AR	Androgen receptor
Q07812	BAX	Apoptosis regulator BAX

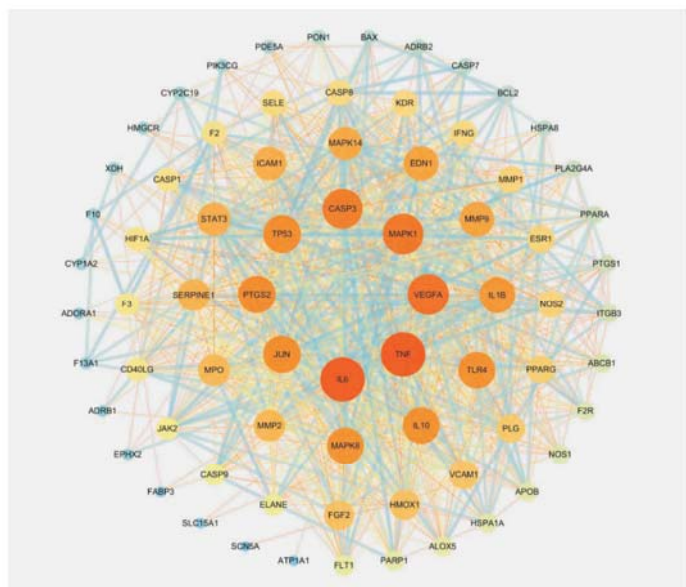


Fig 2 PPI network diagram of Ginseng-Rhodiola Rosea and MIRI targets

2.6 GO 基因功能和 KEGG 信号通路富集分析

GO 功能分析结果显示,生物学过程 (biological process, BP) 318 个,分子生物学功能 (molecular function, MF) 55 个、细胞组成过程 (cellular components, CC) 34 个,KEGG 信号通路 89 条,将 Log₁₀ *P* 值排名前 20 的结果进行可视化,见 Fig 4。

人参-红景天治疗 MIRI 涉及的生物过程包括 RNA 聚合酶 II 转录因子的正调控、对脂多糖的应答、凋亡过程的负调控、炎症应答、血管再生等,涉及的通路则包括 TNF- α 、HIF-1、PI3K-Akt 及 MAPK 信

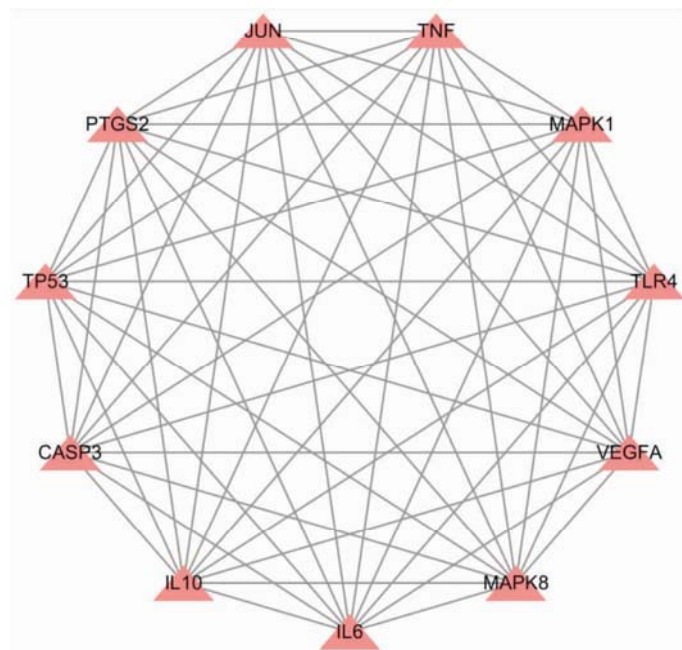


Fig 3 Top 11 target proteins in PPI network graph in terms of frequency of interactions

号通路等,通路具体结果见 Tab 3,涉及的细胞过程主要集中在转录因子结合、蛋白质结合、酶结合、蛋白激酶结合、血红素结合上,其交集蛋白靶点主要富集于胞质、浆膜、细胞质、线粒体、细胞核中,此外,人参-红景天还具有抗甲型流感,抗乙肝病毒,调治非酒精性脂肪肝及调治类风湿性关节炎的作用。

2.7 分子对接 依据“2.4”及“2.5”项的结果,将度值前 5 的有效活性成分与蛋白互作频次前 5 的核心蛋白靶点分别进行分子对接,其配体及蛋白质信息见 Tab 4,对接结合力结果见 Tab 5。

其中与 5 个蛋白靶点对接打分及结合模式均有较好表现的活性成分是豆腐醇,人参皂苷 rh2 与 CASP-3 蛋白有相互作用的活性氨基酸残基包括 TYR-204、PHE-256、GLU-248、PHE-247、TRP-214、ANS-208 等,人参皂苷 rh2 的一端含有疏水链,一端含有亲水糖环,糖环及疏水链上的氧均能与氨基酸 (TYR-204、GLU-248) 的质子形成很强的氢键相互作用,氢键距离较短,结合能力强,这对锚定配体分子有着重要意义,并且其疏水链和疏水性氨基酸 (TYR-204、PHE-256、PHE-247、TRP-214) 形成了很强的疏水作用,可稳定小分子。人参皂苷 rh2 与蛋白口袋匹配度较高,且每一部分能够与口袋的凹槽形成较好的相互作用。综上所述,人参皂苷 rh2 与 CASP-3 蛋白靶点的结合力及对接打分表现最好,其他活性成分与 5 个靶点均能够与位点氨基酸形成氢键,与蛋白靶点匹配度较好,也是人参-红景天治疗 MIRI 过程中发挥疗效的关键成分。

Tab 3 Pathway enrichment results for Ginseng-rhodiola and MIRI crossover targets

GO	Description	Count	-Log10 P	Hits
hsa05200	Pathways in cancer	22	2.41E-10	JUN,NOS2,MMP1,MMP2,F2R,STAT3,PTGS2,FGF2,HIF1A,MMP9,PIK3CG,VEGFA,CASP9,IL-6,MAPK8,CASP8,CASP3,BCL-2,BAX,MAPK1,PPARG,TP53
hsa05145	Toxoplasmosis	18	5.17E-16	IL-10,HSPA8,NOS2,STAT3,MAPK14,TNF-α,CASP9,MAPK8,CASP8,CD40LG,IFNG,CASP3,ALOX5,BCL-2,MAPK1,JAK2,TLR4,HSPA1A
hsa04668	TNF-α signaling pathway	17	7.47E-15	JUN,EDN1,VCAM1,PTGS2,MAPK14,SELE,TNF-α,MMP9,PIK3CG,ICAM1,CASP7,IL-6,MAPK8,CASP8,IL-1β,CASP3,MAPK1
hsa05164	Influenza A	17	1.69E-11	HSPA8,JUN,PLG,MAPK14,TNF-α,PIK3CG,ICAM1,CASP9,IL-6,MAPK8,IFNG,IL-1β,CASP1,MAPK1,JAK2,TLR4,HSPA1A
hsa05152	Tuberculosis	16	2.55E-10	IL-10,NOS2,MAPK14,TNF-α,CASP9,IL-6,MAPK8,CASP8,IFNG,IL-1β,CASP3,BCL-2,BAX,MAPK1,JAK2,TLR4
hsa05205	Proteoglycans in cancer	16	1.43E-09	ITGB3,MMP2,STAT3,MAPK14,FGF2,HIF1A,ESR1,TNF-α,MMP9,PIK3CG,VEGFA,CASP3,KDR,MAPK1,TP53,TLR4
hsa05161	Hepatitis B	15	1.91E-10	JUN,STAT3,TNF-α,MMP9,PIK3CG,CASP9,IL-6,MAPK8,CASP8,CASP3,BCL-2,BAX,MAPK1,TP53,TLR4
hsa04066	HIF-1 signaling pathway	14	1.20E-11	EDN1,FLT1,NOS2,STAT3,SERPINE1,HIF1A,PIK3CG,VEGFA,IL-6,IFNG,BCL-2,HMOX1,MAPK1,TLR4
hsa05142	Chagas disease (American trypanosomiasis)	14	3.40E-11	IL-10,JUN,NOS2,SERPINE1,MAPK14,TNF-α,PIK3CG,IL-6,MAPK8,CASP8,IFNG,IL-1β,MAPK1,TLR4
hsa04151	PI3K-Akt signaling pathway	14	4.87E-05	FLT1,ITGB3,F2R,FGF2,PIK3CG,VEGFA,CASP9,IL-6,KDR,BCL-2,MAPK1,JAK2,TP53,TLR4
hsa05133	Pertussis	13	1.04E-11	IL-10,JUN,NOS2,MAPK14,TNF-α,CASP7,IL-6,MAPK8,IL-1β,CASP3,CASP1,MAPK1,TLR4
hsa04010	MAPK signaling pathway	12	5.53E-05	HSPA8,JUN,MAPK8,IL-1β,CASP3,PLA2G4A,MAPK1,MAPK14,TNF-α,TP53,FGF2,HSPA1A
hsa05134	Legionellosis	11	1.37E-10	CASP9,HSPA8,IL-6,CASP7,CASP8,IL-1β,CASP3,CASP1,TNF-α,TLR4,HSPA1A
hsa05140	Leishmaniasis	11	2.30E-09	IL-10,JUN,IFNG,NOS2,IL-1β,MAPK1,JAK2,MAPK14,PTGS2,TNF-α,TLR4
hsa04932	Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD)	11	3.22E-06	IL-6,CASP7,JUN,MAPK8,CASP8,IL-1β,CASP3,BAX,PPARA,TNF-α,PIK3CG
hsa04024	cAMP signaling pathway	11	3.52E-05	JUN,MAPK8,F2R,PDE3A,ADORA1,MAPK1,ADRB1,ADRB2,ATP1A1,PPARA,PIK3CG
hsa05144	Malaria	10	1.33E-09	IL-10,IL-6,VCAM1,CD40LG,IFNG,IL-1β,SELE,TNF-α,TLR4,ICAM1
hsa05132	Salmonella infection	10	1.60E-07	IL-6,JUN,MAPK8,IFNG,NOS2,IL-1β,CASP1,MAPK1,MAPK14,TLR4
hsa05323	Rheumatoid arthritis	10	2.67E-07	IL-6,JUN,FLT1,IFNG,MMP1,IL-1β,TNF-α,TLR4,ICAM1,VEGFA
hsa04620	Toll-like receptor signaling pathway	10	1.32E-06	IL-6,JUN,MAPK8,CASP8,IL-1β,MAPK1,MAPK14,TNF-α,TLR4,PIK3CG

Tab 4 Molecular docking protein information table

Gene	Protein name	PDB ID
TNF	Tumor necrosis factor	7KPA
IL-6	Interleukin-6	4O9H
VEGFA	Vascular endothelial growth factor A	5DN2
MAPK1	Mitogen-activated protein kinase 1	4QP2
CASP-3	CASPASE-3	1NMS

Tab 5 Core targets of Ginseng-Rhodiola rosea for treatment of MIRI Virtual docking results of active ingredients (kcal · mol⁻¹)

Name	CASP-3	IL-6	MAPK1	TNF	VEGFA
Beta-Sitosterol	-6.90	-6.20	-7.20	-12.60	-6.80
Ginsenoside-rh2	-8.00	-6.40	-7.50	-11.60	-6.80
p-coumaric-acid	-5.10	-5.50	-5.70	-7.80	-6.00
Salidroside	-6.00	-6.00	-6.40	-9.00	-6.60
Stigmasterol	-7.50	-6.70	-8.80	-13.20	-7.10

最后将有效活性成分与蛋白靶点对接后形成的复合物利用 Pymol2.1 软件进行可视化,得到结合模型图,选择结合性好且匹配度高的进行展示,见 Fig 5。

2.8 动物实验结果

2.8.1 人参-红景天对 MIRI 大鼠心肌组织的影响

假手术组大鼠的心肌组织无明显异常,MIRI 模型组血管充血严重,心肌纤维坏死断裂,伴有炎性细胞点状浸润,心肌细胞水肿且排列紊乱;与 MIRI 模型组相比,人参-红景天组对大鼠心肌纤维坏死,炎性细胞浸润,心肌细胞水肿及血管充血情况有一定程度减轻,说明人参-红景天可以减轻大鼠心肌缺血/再灌注引起的心肌损伤,见 Fig 6。

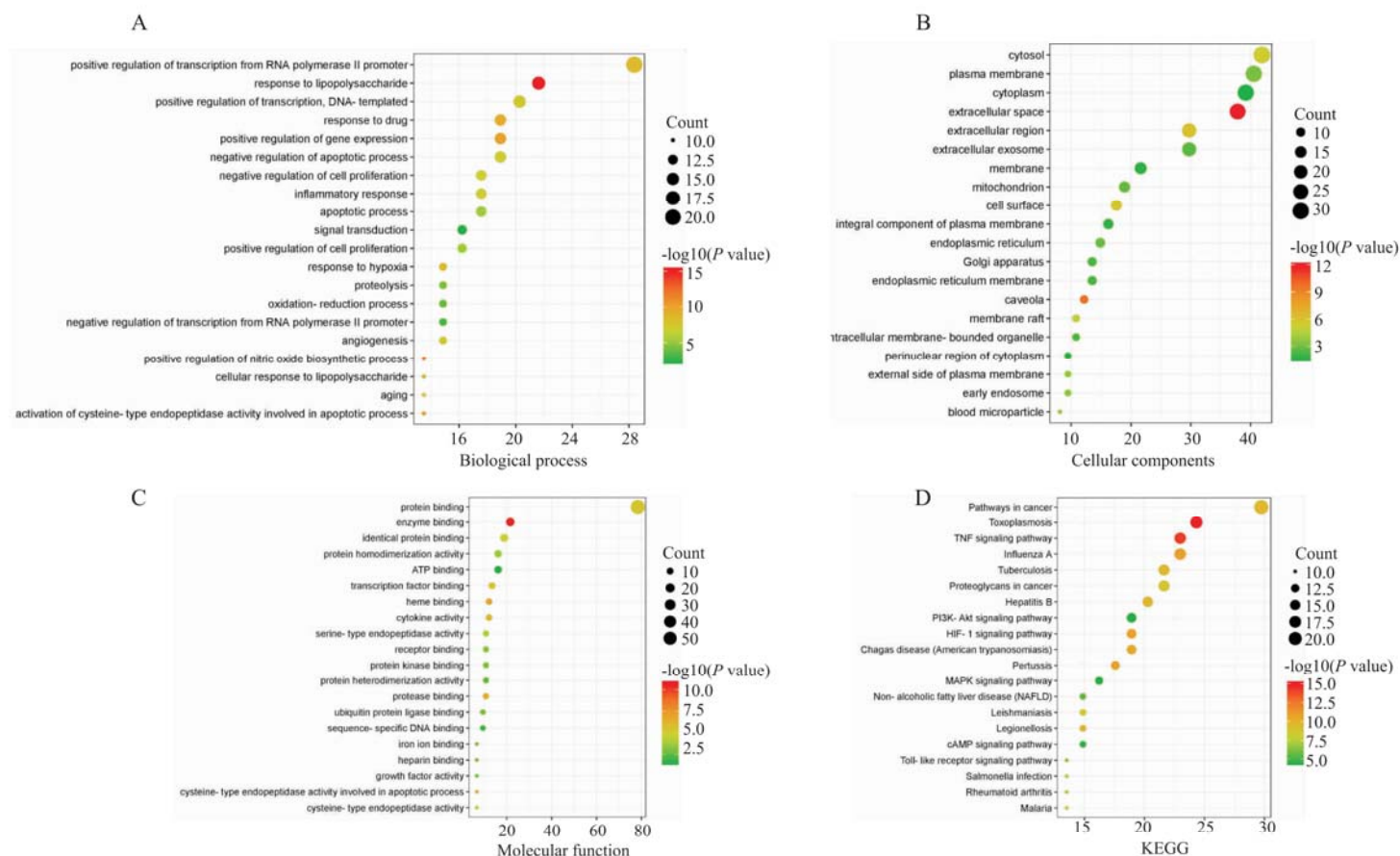


Fig 4 GO gene function and KEGG signaling pathway enrichment results for *Ginseng-Rhodiola rosea* and MIRI intersection targets

A; Biological process; B; Cellular component; C; Molecular function; D; KEGG signaling pathway

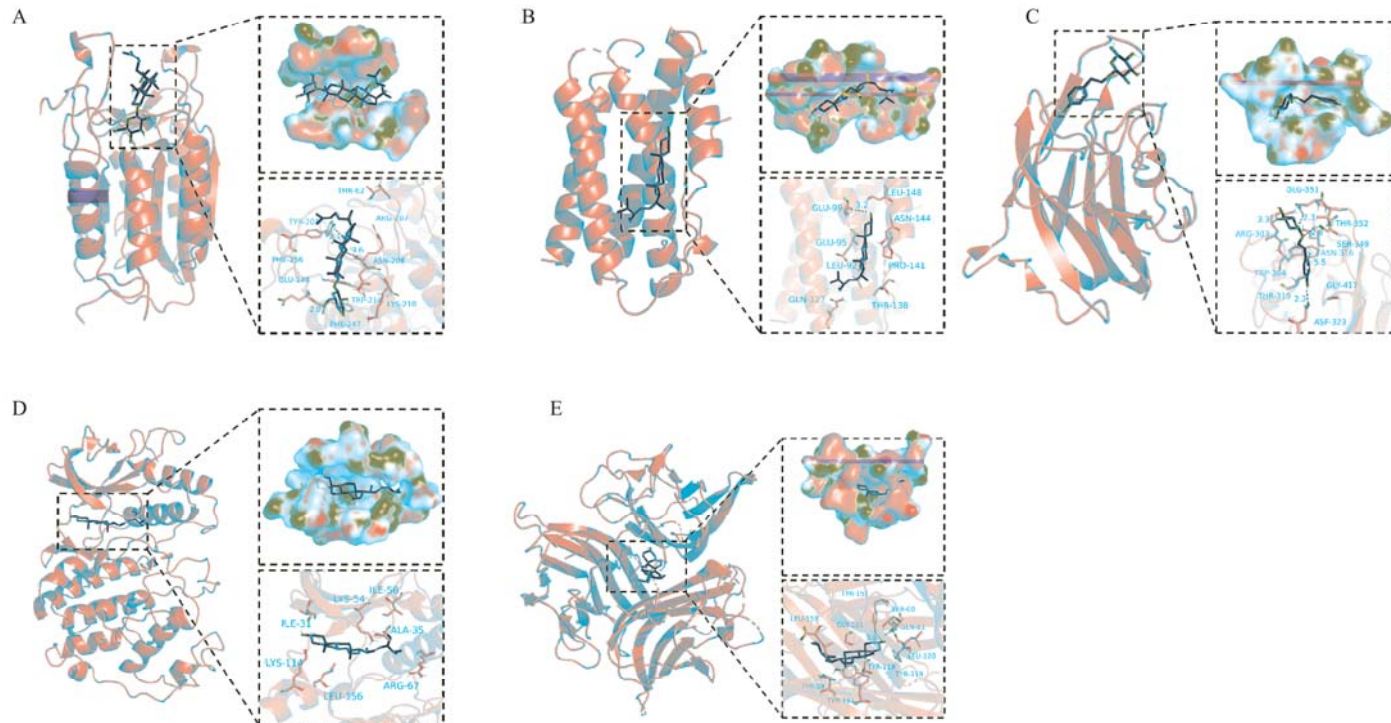


Fig 5 Molecular docking of core active ingredients of *Ginseng-Rhodiola rosea* with key targets

A; The binding mode of CASP-3 protein with ginsenoside rh2; B; The binding mode of IL-6 protein with stigmasterol; C; The binding mode of VEGFA protein with salidroside; D; The binding mode of MAPK1 protein with stigmasterol; E; The binding mode of TNF protein with stigmasterol

2.8.2 ELISA 法检测 TNF- α 与 IL-6 的表达水平
与假手术组相比, MIRI 模型组的 TNF- α 及 IL-6 表达量均明显升高 ($P < 0.05$); 与 MIRI 模型组对比, 人参-红景天组及 3-MA 组的大鼠 TNF- α 及 IL-6

表达量降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 与 3-MA 组相比, 人参-红景天组的 TNF- α 及 IL-6 表达量明显降低 ($P < 0.01$), 见 Tab 6。

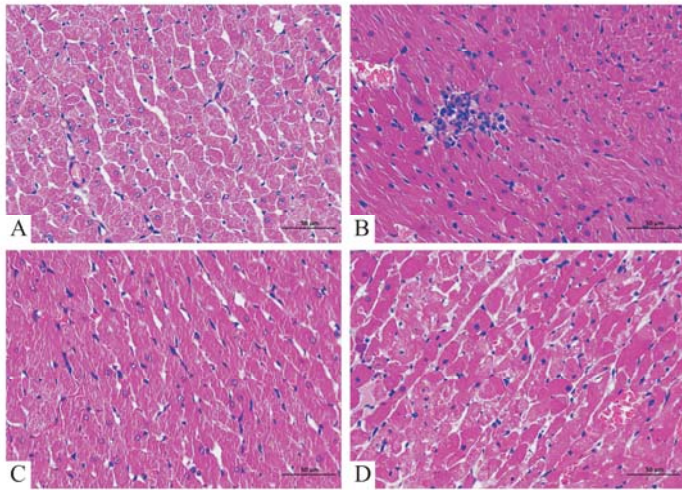


Fig 6 Effect of *Ginseng-Rhodiola rosea* on myocardial tissues of MIRI rats (HE staining, $\times 400$)

A: Sham-operated group; B: MIRI model group; C: Ginseng-Rhodiola group; D: 3-MA group

Tab 6 Effects of *Ginseng-Rhodiola* on expression of IL-6 and TNF- α in MIRI rats ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Group	IL-6/ $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	TNF- α / $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$
Sham	32.39 \pm 2.2	55.09 \pm 1.75
MIRI	38.09 \pm 3.08 [#]	108.37 \pm 3.24 [#]
Ginseng-Rhodiola	32.99 \pm 4.55 ^{**}	64.29 \pm 8.73 ^{**}
3-MA	34.23 \pm 1.68 [*]	84.04 \pm 8.26 [*]

[#] $P < 0.05$ vs sham, ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$ vs MIRI.

3 讨论

中医根据 MIRI 临床症状可将其归为“胸痹”、“真心痛”、“心悸”范畴,病机包括痰瘀及气虚,为本虚标实证,治疗以益气化痰通络为主,人参与红景天均有益气活血化痰之效。

研究结果显示,豆甾醇、 β -谷甾醇、人参皂苷 rh2 及红景天苷等活性成分与 MIRI 蛋白靶点相互作用最多,提示其可能在治疗 MIRI 过程中起到关键作用。现代药理学研究发现,豆甾醇可借助 AMPK-mTOR 和 JNK 途径减轻氧化应激反应^[10]。 β -谷甾醇上调谷胱甘肽氧化还原循环保护受损心肌,具有抗凝血活性^[11]。人参皂苷 rh2 可提升心肌细胞活力,缓解心肌纤维化,并具有抗氧化应激及抗炎作用^[12]。红景天苷能提升 MIRI 大鼠心肌组织中 Akt/GSK-3 β 蛋白表达,减少心肌炎性浸润,促进血管内皮修复^[13]。

PPI 网络显示, TNF- α 、IL-6、VEGFA、MAPK1 等可能是治疗 MIRI 的核心靶点,参与了炎症反应、免疫代谢及细胞增殖的相关通路。TNF- α 及 IL-6 在心肌缺血缺氧后,表达水平升高,促进炎症产生,致使心肌功能障碍; VEGFA 是血管生成、伤口愈合及癌症的调节因子; MAPK1 可调节炎症反应并参与细

胞增殖代谢^[14]。

分子对接验证后显示,豆甾醇与 IL-6、MAPK1 及 TNF- α 等蛋白靶点的配体结合度均较好,其结合力分别为 -6.70、-8.80 及 -13.20 kcal \cdot mol⁻¹。人参皂苷 rh2 与 CASP-3 蛋白靶点的结合力及对接打分表现最好,说明人参皂苷 rh2、红景天苷及豆甾醇等活性成分在治疗 MIRI 中起到关键作用。动物实验结果显示,人参-红景天能减轻 MIRI 大鼠心肌纤维坏死,缓解心肌细胞水肿及浸润情况,降低 MIRI 大鼠 TNF- α 及 IL-6 的表达水平,表明人参-红景天可能通过调控 TNF- α 、IL-6 等核心蛋白靶点,减轻炎症反应,保护心肌细胞,从而减轻缺血心肌损伤。

GO 生物功能及 KEGG 通路富集分析结果显示,人参-红景天通过调节蛋白质结合、酶结合、转录因子结合等过程参与 MIRI 的炎症和免疫反应,主要涉及 TNF- α 、HIF-1、PI3K-Akt、MAPK 等信号通路。TNF 信号通路上的 TNF- α 与 TNF-R1 结合后募集蛋白 FADD,富集 caspase-8 前体,激活并活化下游的 caspase-3,将底物割裂促使心肌细胞凋亡^[15]。在机体缺氧时, HIF-1 信号通路上调与血管相关的蛋白表达水平,增加血流,重构细胞的代谢途径,保护心脏功能,是机体氧稳态的主要调节者^[16]。PI3K-Akt 信号通路激活 PI3K,结合并磷酸化 Akt,启动靶基因转录,作用于 GSK-3 β 时减少心肌细胞凋亡,作用于 mTOR 可减轻炎症反应^[17]。MAPK 信号通路在细胞增殖凋亡和炎症反应中起重要作用,心肌缺氧时产生的活性氧激活 p38MAPK,使细胞色素 C 释放,加重细胞凋亡^[18]。

综上所述,本研究采用了网络药理学方法探究人参-红景天的有效活性成分及其治疗 MIRI 的潜在靶点和信号通路,并利用分子对接技术验证核心活性成分与潜在蛋白靶点的结合能力和匹配度,实验验证人参-红景天对 MIRI 的部分治疗作用及相关蛋白的表达水平,发现在人参-红景天治疗 MIRI 过程中,豆甾醇、人参皂苷 rh2 及红景天苷等活性成分可能作用于 TNF- α 、IL-6、MAPK1、CASPASE-3、VEGFA 等核心蛋白靶点,通过 TNF- α 、HIF-1、PI3K-Akt 等信号通路参与了炎症及免疫反应,保护心肌细胞,减轻心肌损伤,这为临床应用提供了新的理论支撑,也为阐明人参-红景天治疗 MIRI 的潜在作用机制提供了新的方向和思路,后期将继续通过实验研究对关键信号通路加以验证。

参考文献:

- [1] Hausenloy D, Botker H, Engstrom T, et al. Targeting reperfusion injury in patients with ST-segment elevation myocardial infarction: Trials and tribulations[J]. *Eur Heart*, 2017, **38**:935–41.
- [2] 刘瑞, 刘璐, 郭鹏. 心肌缺血/再灌注损伤的发病机制及其防治策略[J]. 世界最新医学信息文摘, 2019, **19**(6):73–4.
- [2] Liu R, Liu L, Guo P. Pathogenesis of myocardial ischemia-reperfusion injury and its prevention and treatment strategies [J]. *World Latest Med Information*, 2019, **19**(6):73–4.
- [3] 常立萍, 尹金珠, 王义强, 等. 参红通络颗粒治疗冠心病稳定型心绞痛[J]. 吉林中医药, 2013, **33**(12):1226–8.
- [3] Chang L P, Yin J Z, Wang Y Q, et al. Treatment of stable angina pectoris in coronary artery disease with Ginseng Hong Tong Luo Granules[J]. *Jilin J Chin Med*, 2013, **33**(12):1226–8.
- [4] 叶晓莉, 李晓峰. 人参皂苷 Rg1 对 1-甲基-4-苯基吡啶离子诱导的 PC12 细胞凋亡的保护作用[J]. 海军军医大学学报, 2011, **32**(9):965–8.
- [4] Ye X L, Li X F. Protective effect of ginsenoside Rg1 on 1-methyl-4-phenylpyridinium ion-induced apoptosis in PC12 cells[J]. *Academic J Naval Med Univ*, 2011, **32**(9):965–8.
- [5] 姚伟峰, 黑子清. 红景天及其有效成分防治器官缺血/再灌注损伤的研究进展[J]. 实用医学杂志, 2015, **31**(3):498–501.
- [5] Yao W F, Hei Z Q. Research progress of *Rhodiola rosea* and its active ingredients in preventing organ ischemia-reperfusion injury [J]. *J Practical Med*, 2015, **31**(3):498–501.
- [6] 段贤春, 黄石, 彭代银, 等. 网络药理学在中药复方研究中的应用[J]. 中国药理学通报, 2020, **36**(3):303–8.
- [6] Duan X C, Huang S, Peng D Y, et al. Application of network pharmacology in the study of Chinese medicine compounding [J]. *Chin Pharmacol Bull*, 2020, **36**(3):303–8.
- [7] 吕伟彤. 近十年红景天植物化学成分研究概况[J]. 化工设计通讯, 2018, **44**(3):249.
- [7] Lyu Y T. Overview of the research on phytochemical composition of *Rhodiola rosea* in the last decade [J]. *Chemical Engineering Design Communications*, 2018, **44**(3):249.
- [8] 于浩楠, 马丽娟, 黄坚, 等. 基于 HPLC-Q-TOF-MS 技术分析红景天颗粒的化学成分及大鼠口服后的入血成分[J]. 上海中医药大学学报, 2021, **35**(1):61–73.
- [8] Yu H N, Ma L J, Huang J, et al. Analysis of the chemical composition of *Rhodiola rosea* granules based on HPLC-Q-TOF-MS technique and the blood entry components of rats after oral administration[J]. *Academic J Shanghai Univ Tradit Chin Med*, 2021, **35**(1):61–73.
- [9] 王峥, 王亚君, 满晓静, 等. 红景天治疗心血管疾病研究进展[J]. 创伤与急救重症医学, 2019, **7**(4):258–62.
- [9] Wang Z, Wang Y J, Man X J, et al. Research progress of *Rhodiola rosea* in the treatment of cardiovascular diseases [J]. *Trauma Critical Care Med*, 2019, **7**(4):258–62.
- [10] Sun J, Li X, Liu J, et al. Stigmasterol exerts neuro-protective effect against ischemic/reperfusion injury through reduction of oxidative stress and inactivation of autophagy[J]. *Neuropsychiatr Dis Treat*, 2019, **15**:2991–3001.
- [11] Gogoi D, Pal A, Chattopadhyay P, et al. First report of plant-derived β -sitosterol with antithrombotic, *in vivo* anticoagulant, and thrombus-preventing activities in a mouse model[J]. *J Nat Prod*, 2018, **81**(11):2521–30.
- [12] LO S, SU C, NIU H, et al. Ginsenoside rh2 improves cardiac fibrosis via PPAR δ -STAT3 signaling in type 1-like diabetic rats[J]. *Int J Mol Sci*, 2017, **18**(7):1364.
- [13] 戎浩, 马辉, 朱敏侠. 藏药红景天苷对心肌缺血/再灌注损伤的保护机制研究进展[J]. 中国民族医药杂志, 2018, **24**(8):59–60.
- [13] Rong H, Ma F, Zhu M M. Progress of research on the protective mechanism of tibetan medicine rhodiol glycosides against myocardial ischemia-reperfusion injury[J]. *J Med Pharm Chin Minorities*, 2018, **24**(8):59–60.
- [14] Kumar A, Singh U, Kini S, et al. JNK pathway signaling: A novel and smarter therapeutic targets for various biological diseases[J]. *Future Med Chem*, 2015, **7**(15):2065–86.
- [15] 刘媛媛, 田学峰, 霍红, 等. 心肌缺血/再灌注损伤患者血清 TNF- α 和 IL-10 水平变化及意义[J]. 中国医学前沿杂志(电子版), 2018, **10**(1):79–82.
- [15] Liu Y Y, Tian X F, Huo H, et al. Changes and significance of serum TNF- α and IL-10 levels in patients with myocardial ischemia-reperfusion injury[J]. *Chin J Frontiers Med Sci (Electronic Version)*, 2018, **10**(1):79–82.
- [16] 王文香, 张妞妞, 曾先燕, 等. HIF-1 α 抗心肌缺血/再灌注炎症性损伤的作用[J]. 中国病理生理杂志, 2018, **34**(7):1201–5.
- [16] Wang W X, Zhang N N, Zeng X Y, et al. Role of HIF-1 α against myocardial ischemia-reperfusion inflammatory injury[J]. *Chin J Pathophysiology*, 2018, **34**(7):1201–5.
- [17] Sciarretta S, Forte M, Frati G, et al. New insights into the role of mTOR signaling in the cardiovascular system[J]. *Circ Res*, 2018, **122**(3):489–505.
- [18] Yu D, Li M, Tian Y, et al. Luteolin inhibits ROS-activated MAPK pathway in myocardial ischemia-reperfusion injury[J]. *Life Sci*, 2015, **122**:15–25.

Mechanism of *Ginseng-Rhodiola rosea* in treatment of myocardial ischemia-reperfusion injury based on network pharmacology and molecular docking

ZHAO Qian-lin¹, LAI Ying-rong¹, JIANG Li-hong²

(1. College of Traditional Chinese Medicine, Changchun University of Traditional Chinese Medicine, Changchun 130117, China;

2. Affiliated Hospital of Changchun University of Traditional Chinese Medicine, Changchun 130021, China)

Abstract: **Aim** To investigate the sites and mechanisms of action of *Ginseng-Rhodiola rosea* in the treat-

网络出版时间:2023-05-09 16:29:17 网络出版地址:https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1086.R.20230508.1432.052.html

◇ 复方药物药理学 ◇

朝医鹿茸大补汤对咳嗽变异性哮喘豚鼠 TLR4/WNT-5A 信号通路的影响

李慧文^{1,2}, 金丽娜^{1,3}, 宋艺兰^{1,3}, 李良昌^{1,3}, 延光海^{1,3}, 孟庆玲^{1,3}, 李欢^{1,3}, 刘凯月^{1,3}, 郑明昱^{1,3}

(1. 吉林省过敏性常见疾病免疫与靶向研究重点实验室, 2. 延边大学附属医院新生儿科, 3. 延边大学医学院, 吉林 延吉 133002)

doi:10.12360/CPB202111109

文献标志码:A 文章编号:1001-1978(2023)05-0978-08

中国图书分类号:R-332; R282.74; R322.35; R441.5; R562.25

摘要:目的 探讨鹿茸大补汤对咳嗽变异性哮喘的作用机制。方法 将豚鼠随机分为正常组(CON)、模型组(OVA)、鹿茸大补汤高剂量组(HIGH)、鹿茸大补汤低剂量组(LOW)、地塞米松组(DEX)。通过烟熏加注射卵清蛋白(OVA)、氢氧化铝溶液及雾化吸入激发咳嗽来创建咳嗽变异性哮喘(cough variant asthma, CVA)模型。最后一次刺激豚鼠后24 h内解剖,取其肺泡灌洗液(BALF)和肺组织。利

用免疫吸附(ELISA)法测定BALF中炎症细胞种类和炎症细胞因子的含量;取左肺中叶,进行HE染色和Masson染色,观察病理变化;用免疫组织化学染色法观察肺部组织中TLR4和WNT-5A蛋白的表达分布;从左肺上叶提取蛋白做免疫蛋白印迹(Western blot),测肺组织中TLR4、WNT-5A蛋白水平;用免疫荧光法检测肺组织中TLR4、WNT-5A荧光强度;采用流式细胞术在豚鼠肺组织中检测IL-4和IFN- γ 。结果 鹿茸大补汤能够改善豚鼠气道炎症反应,抑制胶原纤维沉积,降低BALF中IL-4、IL-5、IL-13含量,抑制肺组织中TLR4、WNT-5A的蛋白表达,升高肺组织中的IFN- γ 水平,同时降低IL-4水平。结论 鹿茸大补汤可能通过TLR4/WNT-5A信号通路抑制CVA的发生。

收稿日期:2022-12-10,修回日期:2023-03-15

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No 82060911)

作者简介:李慧文(1988-),女,博士,主治医师,研究方向:小儿哮喘, E-mail:1749522509@qq.com;

郑明昱(1974-),男,硕士,副教授,研究方向:过敏性哮喘、朝医基础,通信作者, E-mail:myzheng@ybu.edu.cn

关键词:朝医;鹿茸大补汤;咳嗽变异性哮喘;TLR4;WNT-5A;豚鼠

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



ment of myocardial ischemia-reperfusion injury (MIRI) via using network pharmacology approach, molecular docking techniques and experimental studies. **Methods** The active ingredients and targets of *Ginseng-Rhodiola rosea* were screened through the TCMSP database and literature supplementation, and the GENECARDS, DISGENET and DRUGBANK databases were searched to obtain the targets of MIRI. Functional protein interaction networks (PPIs) and the STRING database were used to screen out core targets. The DAVID database was also selected for gene ontology functional analysis (GO) and KEGG signaling pathway enrichment analysis. Lastly, the preliminary validation was performed with the help of molecular docking techniques and experimental studies. **Results** Forty-three active ingredients and 348 potential targets of *Ginseng-Rhodiola* were obtained, and targets such as IL-6, TNF- α and VEGFA were found to be closely related to MIRI, mainly involving TNF, PI3K-Akt, HIF-1 and other signaling pathways. The molecular docking results

showed that soyesterol, ginsenoside rh2 and rhodiololide had good binding effects and high matching with IL-6, TNF- α , Caspase-3, VEGFA, MAPK1 and other targets, among which the best binding was between Caspase-3 and ginsenoside rh2. The results of the experimental study further showed that *Ginseng-Rhodiola rosea* could improve myocardial tissue necrosis after myocardial ischemia-reperfusion, reduce myocardial cell edema and vascular congestion, and decrease the expression levels of TNF- α and IL-6 in MIRI rats. **Conclusions** *Ginseng-Rhodiola* may modulate multiple targets such as IL-6, TNF- α , Caspase-3, VEGFA and MAPK1 through soyesterol, ginsenoside rh2 and rhodiol glycosides to inhibit inflammatory response and oxidative stress, reduce cardiomyocyte damage and exert therapeutic effects on MIRI.

Key words: *Ginseng-Rhodiola rosea*; myocardial ischemia-reperfusion injury (MIRI); network pharmacology; molecular docking; core targets; signaling pathway