

网络出版时间:2021/12/22 16:47 网络出版地址:https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20211221.1001.026.html

网络药理学分析及实验验证银丹心脑通保护 MIRI 的作用机制

徐启丽¹, 邹常超², 莫丽莉¹, 周海燕¹, 刘兴德^{1,2}

摘要 目的 基于网络药理学探讨银丹心脑通软胶囊(YD)治疗心肌缺血再灌注损伤(MIRI)的物质基础、作用机制和实验验证,为该药治疗 MIRI 提供理论参考。方法 利用TCMSP、Swiss Target Prediction、中国知网等数据库检索 YD 的主要活性成分和作用靶点, GeneCards 数据库筛选 MIRI 疾病靶点, Cytoscape 软件构建“药物-成分-疾病-靶点”网络关系, 富集分析预测作用机制, 并将排名前三的主要活性成分与 PPI 网络中排名前六的靶点进行分子对接验证。人心肌 AC-16 细胞进行低氧/复氧(H/R)模型构建, 初步验证核心靶点。通过 CCK-8 比色法检测细胞活力, 探索最适药物浓度。光镜下观察银丹心脑通对心肌细胞形态学变化影响。LDH 渗漏检测细胞膜完整性; Western blot 检测 STAT3、p-STAT3、PI3K、AKT1 和 p-AKT1 的表达。结果 共得到 YD 活性成分 105 个, 药物靶点 382 个, MIRI 疾病靶点 1 223 个, 药物-疾病共同靶点 160 个, 关键靶点涉及 AKT1、STAT3、VEGFA、TNF、MAPK8、PIK3CA 等, GO 析主要涉及细胞凋亡、脂溶反应、肌肉细胞增殖、细胞因子介导的炎症反应、氧化应激等。分子对接结果显示, VEGFA、APP、PIK3CA 与槲皮素、木犀草素、山柰酚都能较好的结合。细胞实验显示, 200 mg/L 的 YD 能显著地促进 AC-16 细胞增殖, 减少 LDH 渗漏。Western blot 结果显示, 银丹心脑通能激活 STAT3 和 PI3K-AKT1 信号通路, 保护心肌。结论 YD 能通过多成分、多靶点、多通路保护 MIRI。

关键词 银丹心脑通; MIRI; 网络药理学; 分子对接; 槲皮素; 木犀草素; 山柰酚

中图分类号 R 285

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2022)01-0131-08

2021-09-08 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 82060855, 31760294); 贵州省科技计划项目(编号: 黔科合平台人才[2018]5608); 贵阳市科技计划项目(编号: 筑科合同[2017]30-10); 贵州省教育厅青年科技人才成长项目(编号: 黔教合 KY 字[2018]182)

作者单位: ¹ 贵州医科大学附属医院心血管内科, 贵阳 550000

² 贵州中医药大学第二附属医院心血管内科, 贵阳 550000

作者简介: 徐启丽, 女, 硕士;

刘兴德, 男, 博士, 教授, 博士生导师, 责任作者, E-mail: lxd@gmc.edu.cn;

周海燕, 女, 博士, 主管技师, 责任作者, E-mail: zhouhaiyan12388@126.com

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.01.025

冠状动脉粥样硬化性心脏病(coronary heart disease, CHD), 简称冠心病, 是危害人类健康、造成中国人疾病负担的主要疾病之一, 且发病率呈逐年上升趋势^[1-2]。随着再灌注治疗的不断发展, CHD 患者的病死率下降, 远期预后得到明显改善, 然而心肌再灌注引起的心律失常、无复流、心肌细胞凋亡等, 对患者的预后有着深远的影响。临床研究表明^[3-5], 银丹心脑通可以降低冠心病患者心绞痛发作频率、心绞痛持续时间, 改善慢性心力衰竭患者心功能, 降低心血管事件发生率。然而目前对该药治疗心肌缺血再灌注损伤(myocardial ischemia reperfusion injury, MIRI)的药理机制研究较少, 该研究旨在利用网络药理学方法探讨该作用机制, 为银丹心脑通软胶囊(Yindan Xinnaotong soft capsules, YD)应用于临床应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 网络药理学 检索下列数据库: TCMSP 数据库(<http://tcmsp.com/tcmsp.php>), 中国知网(<http://search.cnki.net>), SwissTargetPrediction 数据库(<http://www.swisstargetprediction.ch/>), Uniprot 数据库(<https://www.uniprot.org/>), GeneCards 数据库(<https://www.genecards.org/>), STRING 数据库(<https://string-db.org/>), Metascape 数据库(<https://metascape.org/>); 使用下列软件: Cytoscape3.7.2 软件, R3.6.0 软件, 微生信在线作图软件(<http://www.bioinformatics.com.cn/>), Autodock 2.5.0, Autodock vina 1.1.2, Pymol 开源版等。

1.2 细胞实验 人心肌 AC-16 细胞株购自美国模式培养物研究所(ATCC)。胎牛血清、1%青霉素-链霉素混合液、DMEM-basic(1×)培养液、胰蛋白酶(美国 Gibco 公司); 银丹心脑通软胶囊(贵州百灵企业集团制药股份有限公司); DMSO(美国 Sigma 公司); 细胞增殖与毒性检测试剂盒 CCK-8(日本同仁化学研究所); 乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)检测试剂盒(南京建成生物工程研究所); 蛋

白印迹相关试剂均购自北京索莱宝科技有限公司;抗体:AKT1、p-AKT1、p-STAT3 多克隆抗体(美国 CST 公司),PI3K(美国 abcam 公司),STAT3 多克隆抗体(沈阳万类生物科技有限公司),GAPDH 多克隆抗体、二抗山羊抗兔二抗(武汉三鹰生物技术有限公司)。

1.3 方法

1.3.1 网络药理学

1.3.1.1 化学成分收集 在 CNKI 数据库上对 YD 的药物组成及相关活性物质进行搜集,通过 TC-MSP 数据库进行 ADME 参数设置($OB \geq 30\%$ 且 $DL \geq 0.18$),筛选出符合条件的活性物质作为活性成分。

1.3.1.2 靶点的预测筛选及中药活性成分-靶点网络构建 将筛选得到的活性成分导入 Swiss Target Prediction,物种选择为“人类”(Homo sapiens),进行靶标预测。利用 UniProt 数据库对靶点处理,得到靶基因的标准名称。利用 GeneCards 数据库对“心肌缺血再灌注损伤”(myocardial ischemia reperfusion injury, MIRI)进行疾病靶点筛选。然后,将得到的药物活性成分相关靶点与疾病靶点取交集,重合的靶点即为 YD 活性成分作用于 MIRI 的相关靶点。

1.3.1.3 靶点蛋白相互作用网络构建及关键靶点筛选 利用 STRING 在线数据库对靶点的蛋白间相互作用(protein protein interaction, PPI)进行分析。将靶点信息导入 STRING 数据库,物种选择“Homo sapiens”,将蛋白互作综合得分 > 0.7 作为筛选条件从而得到靶点的 PPI 信息,将得到的 PPI 信息导入 Cytoscape 软件,得到 PPI 网络图可视化。

1.3.1.4 靶点基因本体论(gene ontology, GO)和 KEGG 通路富集分析 Metascape 数据库中提交交集靶集点,进行 GO 和 KEGG 富集分析。

1.3.1.5 分子对接验证 从 Pubchem 下载活性成分结构式,保存为 *mol2 格式,利用 pymol 转换为 *pdb 格式;从 PDB 数据库下载蛋白 3D 结构 *pdb 格式。利用 Auto dock 进行加氢、计算电荷等处理,保存为 pdbqt 文件,并用 Autodock Vina 进行小分子与蛋白对接,将对接结果导入 Pymol 进行分子对接做图。

1.3.2 细胞实验

1.3.2.1 细胞培养 取对数期生长良好的 AC-16 细胞,种植在加有 10% 胎牛血清、1% 青霉素-链霉素混合液的 DMEM 中,于 37 °C、提供 5% CO_2 饱和

湿度细胞培养箱中培养。

1.3.2.2 低氧/复氧模型构建 收集对数期生长良好的 AC-16 细胞种植在培养板中,于 37 °C、5% CO_2 、95% 的新鲜空气培养箱中培养。贴壁后将进行低氧处理的 AC-16 细胞更换为不含有胎牛血清的培养液。按预定分组进行加药,需进行低氧处理的 AC-16 细胞于含有 1% O_2 、94% N_2 、5% CO_2 缺氧培养箱中孵育 24 h 后,将细胞放置在 37 °C、含有 5% CO_2 、95% 新鲜空气培养箱中培养 4 h。进行下一步检测。

1.3.2.3 CCK-8 比色法检测细胞活力 收集 AC-16 细胞调整细胞密度为 1×10^5 个/ml,按每孔 100 μ l 细胞悬液接种到 96 孔板中,培养过夜。按照不同浓度的 YD 进行分组:0、50、200、400 mg/L,复孔 5 个/组,每组均设置不加细胞的空白组进行对照,以消除药物本身的颜色对吸光度的影响。加药后按照 1.3.2.2 中方法进行缺氧,待细胞复氧结束后,在每孔中加入 10 μ l CCK-8 溶液,37 °C 孵育 2 h,酶标仪检测 OD 值。细胞活力 = $[(\text{实验孔} - \text{空白孔})]/[(\text{对照孔} - \text{空白孔})]$ 。选取细胞活力最强的药物浓度进行后续实验。

1.3.2.4 乳酸脱氢酶(LDH)渗漏检测 将细胞分成低氧/复氧组(H/R 组)、低氧/复氧 + 银丹心脑通组(H/R + YD 组),细胞复氧结束后,收集细胞培养液上清液,按照试剂盒中检测步骤,进行 LDH 渗漏检测。

1.3.2.5 Western blot 检测蛋白表达 将 AC-16 细胞分成对照组(Control 组)、银丹心脑通组(YD 组)、H/R 组、H/R + YD 组。低氧复氧处理结束后,吸去培养液,裂解液充分裂解后,转移至 1.5 ml EP 管中,4 °C 离心,14 000 r/min,20 min。将蛋白上清液转移至新的 EP 管中,BCA 法检测蛋白浓度。按比例加入 5 $\times$ Loading buffer,100 °C 煮沸 10 min。每孔取 40 μ g 蛋白进行聚丙烯酰胺凝胶电泳,转膜结束后用质量分数为 5% 的脱脂牛奶封闭 1 h,一抗孵育过夜,次日二抗孵育 1 h, Bio-Rad 成像仪显影成像, Image Lab 软件进行灰度分析。

1.4 统计学处理 数据均采用 GraphPad Prism 8 进行统计分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组数据分析采用单因素方差分析,两组数据比较用 t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 YD 的活性成分筛选利用 TC-MSP 数据库对

YD 所含成分进行检索。其中,山楂、艾片未检索到相关结果,大蒜未筛选到符合 ADME 参数的成分,通过文献检索获取这 3 味药的有效成分,并将其纳入统计;根据 ADME 参数对余下的 6 味药物进行筛选。去重后共得到 YD 105 个活性成分,其中银杏 20 个,丹参 48 个,绞股蓝 10 个,细辛 11 个,三七 8 个,大蒜 4 个;山楂 5 个,艾片 4 个。见表 1。

表 1 药物-成分-靶点统计

中药名称	成分数(个)	预测靶点数(个)
丹参	48	256
银杏叶	20	138
灯盏细辛	11	92
绞股蓝	10	83
三七	8	85
山楂	5	79
艾片	4	59
大蒜	4	60

2.2 潜在靶点的预测 取每个活性成分在 Swiss Target Prediction 数据库中得到的预测靶点的前 15 名,去重后共得到药物靶点 382 个。从 GeneCards 数据库中得到“MIRI”疾病靶点 1 223 个,药物-疾病共同靶点 160 个。见图 1。其中包括 TNF、MAKP、IL-2、IL-6、MMP、PPAR、PIK3 等。

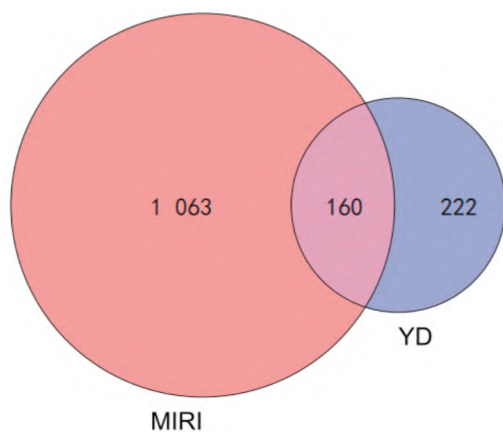


图 1 YD 与 MIRI 靶点韦恩图

2.3 活性成分-靶点网络分析 利用 Cytoscape 软件构建 YD 药物-成分-疾病-靶点的相互作用网络,该网络含有 485 个节点,1 822 个化合物-靶标关系。其中有 95 个化合物可同 15 个及以上的靶点相互连接,推测这些化合物可能是 YD 的主要活性成分药效物质基础,其中排名前 30 的活性成分。见表 2。有 46 个靶蛋白可同 10 个及以上的活性成分产生相互作用。见表 3。

表 2 度值(degree)排名前 30 的活性化合物

编号	化合物名	来源	degree
YX17	槲皮素	银杏叶、山楂、灯盏细辛、三七	80
YX14	木犀草素	银杏叶、山楂、灯盏细辛、丹参	68
YX11	山奈酚	银杏叶、山楂、灯盏细辛	48
YX19	豆甾醇	银杏叶、三七、山楂	48
SQ4	人参皂甙 R2	三七、绞股蓝	37
SQ1	β -谷固醇	银杏叶、三七	32
YX16	亚油酸乙酯	银杏叶、三七	32
JGL7	谷甾醇	绞股蓝、山楂	32
DS8	丹酚 B	丹参	21
SQ5	人参皂甙 Rb2	三七	21
DS28	紫丹参素 c	丹参	20
DS37	丹参酮	丹参	20
DS42	甲酰基丹参酮	丹参	20
DS48	丹参酮 II B	丹参	20
DS9	脱氢丹参酮 II A	丹参	20
YX4	金圣草黄素	银杏叶	20
YX5	香叶木素	银杏叶	20
DS15	异丹参酮 II	丹参	19
DS1	1,2,5,6-四氢丹参酮	丹参	18
DS31	沙丁烯酮	丹参	18
DS32	鼠尾草酚酮	丹参	18
DS12	二氢丹参酮 I	丹参	17
DS13	表丹参螺缩酮内脂	丹参	17
DS19	微甾醇	丹参	17
DS20	丹参环庚三烯酚酮	丹参	17
JGL2	环黄杨碱	绞股蓝	17
XX11	1-羟基-2,3,5-三甲氧基黄酮	灯盏细辛	17
XX4	黄芩素	灯盏细辛	17
AP2	樟脑	艾片	16
AP3	左旋龙脑	艾片	16

表 3 能与 10 个及以上的活性成分相关联的基因

基因名	degree	基因名	degree
AKR1B1	49	ADORA1	17
CYP19A1	44	CA4	17
AR	38	RORC	16
ACHE	30	PTPN6	16
CES2	29	HMGCR	16
ESR1	29	CYP2C19	16
CA2	28	PTPN11	15
CA7	27	STAT3	15
CES1	24	CYP51A1	15
CA12	24	NPC1L1	15
ALOX5	23	SREBF2	15
ESR2	23	PTPRC	14
PTPN1	23	PTGS2	14
SHBG	22	PTGS1	14
XDH	21	EED	13
CYP17A1	21	ABCC1	13
NOX4	20	HSD17B1	13
CDC25B	19	TERT	12
NR1H3	18	ABCB1	11
SLC6A2	18	EGFR	11
FLT3	17	CYP1B1	11
MAOA	17	CNR2	10
CDC25A	17	CHRM2	10

2.4 YD 治疗 MIRI 的 PPI 网络构建 通过在

STRING 数据库中录入药物 - 疾病共同靶点, 选择综合得分大于 0.7 的靶点, 并去掉独立于网络外的靶点, 得到的 PPI 网络关系数据导入 Cytoscape 软件进行可视化分析, 构建 PPI 网络关系图。见图 2。在该网络关系图中, 包含 139 个节点和 725 个关系, 大于平均度值 8 的靶点共 70 个, 其中包括 AKT1、HSP90、MAPK8、BCL2-L1、IL2 等。根据度值 (degree)、中介中心性 (betweenness)、接近中心性 (closeness) 分别筛选出前 10 名的基因, 去重后得到 13 个关键靶点, 分别是 AKT1、STAT3、VEGFA、TNF、MAPK8、PIK3CA、F2、PPARA、APP、PTGS2、SRC、ESR1、HSP90AA1。推测 YD 可能通过这些靶点发挥抗 MIRI 作用。见表 4。

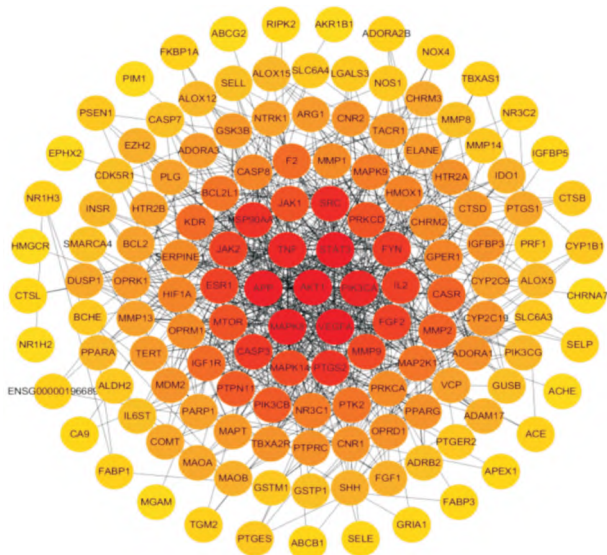


图2 YD 治疗 MIRI 的 PPI 网络

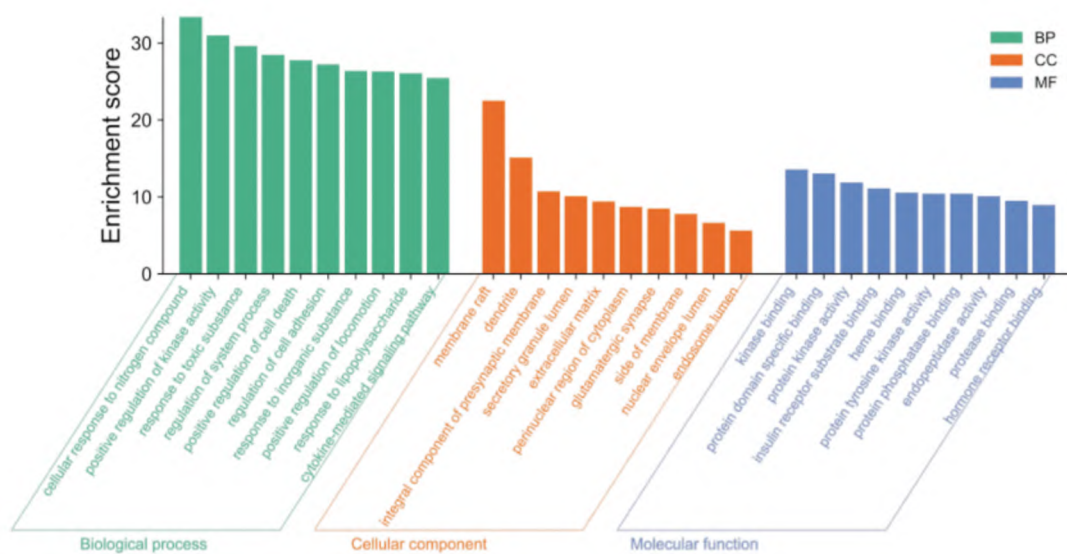


图3 GO 生物学过程分析、细胞组分分析、生物功能分析

表 4 PPI 网络中 Top 的靶点

基因名	degree	基因名	betweenness	基因名	closeness
AKT1	44	APP	2 725.114	AKT1	86.033
STAT3	40	PTGS2	2 705.400	STAT3	85.500
VEGFA	40	AKT1	2 077.037	VEGFA	85.033
APP	37	STAT3	1 678.866	MAPK8	82.700
MAPK8	35	VEGFA	1 532.840	APP	81.833
PIK3CA	33	TNF	1 375.746	TNF	80.916
TNF	30	MAPK8	1 338.132	PIK3CA	80.167
SRC	28	PIK3CA	1 115.434	SRC	77.283
PTGS2	26	F2	835.879	PTGS2	75.583
HSP90AA1	26	PPARA	833.420	ESR1	75.533

2.5 靶点通路富集分析 将 160 个共同靶点导入 Metascape 数据库中进行 GO 分析, 设置 Pvalue ≤ 0.01 , 得到的分析结果, 分别取前 10 名导入微生信在线作图软件绘制富集分析图。KEGG 分析主要与 TRP 通道的炎性介质调节、脂肪细胞脂解调节、PPAR 信号通路、流体剪应力与动脉粥样硬化、血小板活化、钙信号通路等相关。生物过程 (biological process, BP) 主要与细胞对氮化合物的反应、肌肉细胞增殖、细胞因子介导的炎症反应、氧化应激、细胞凋亡、脂溶反应等密切相关。细胞组成 (cellular component, CC) 主要涉及膜筏、细胞器外膜、内体管腔、膜的外在成分、血小板 α 颗粒、质膜蛋白复合物、溶酶体管腔、受体复合物等。分子功能 (molecular function, MF) 主要富集为生长因子受体结合、肽结合、激素受体结合、蛋白酶结合、内肽酶活性、蛋白磷酸酶结合、蛋白酪氨酸激酶活性、胰岛素受体底物结合、氧化还原酶活性结合等。见图 3、4。

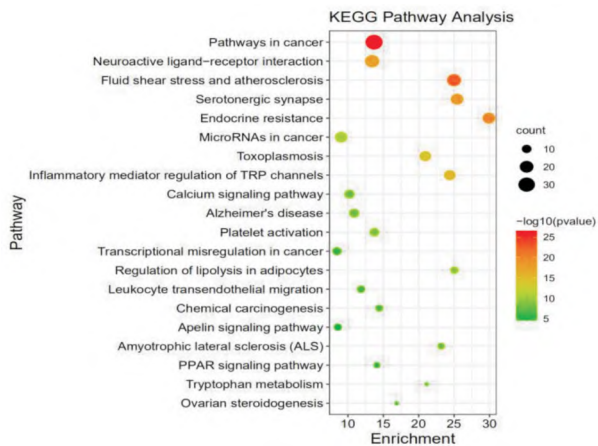


图4 KEGG 富集分析

2.6 核心成分的分子对接验证 将 YD 度值排名前 3 的化合物与 PPI 网络中排名前 6 的靶点进行分子对接验证。通常认为结合能 < -5 kcal/mol 提示两者可以结合, < -7 kcal/mol 提示两者有较好的结合能力。结果显示, AKT1、STAT3、VEGFA、APP、MAPK8、PIK3CA 均能与槲皮素、木犀草素、山柰酚结合。其中 VEGFA、APP、PIK3CA 能与主要成分较好的结合。见表 5 和图 5。

表5 蛋白与小分子结合能 (kcal/mol)

蛋白名 (PDB ID)	化合物名 (MOL ID)		
	槲皮素 (MOL000098)	木犀草素 (MOL000006)	山柰酚 (MOL000422)
AKT1(1UNQ)	-6.4	-7.1	-5.9
STAT3(6SM8)	-6.5	-8.4	-7.7
VEGFA(4QAF)	-7.7	-8.1	-7.5
APP(3VEU)	-7.5	-8.1	-7.6
MAPK8(2XRW)	-6.9	-7.7	-6.6
PIK3CA(4JPS)	-9.3	-9.1	-8.2

2.7 YD 对 H/R 损伤诱导的 AC-16 细胞活力的影响 通过 CCK-8 比色法分析在 H/R 损伤诱导下, 暴露于不同浓度 YD 的 AC-16 细胞系的细胞活力。结果表明, 200 mg/L 的剂量可增加 H/R 损伤诱导的 AC-16 细胞的细胞活力 ($P < 0.0001$), 见图 6A。因此, 将增加 AC-16 细胞活力的 200 mg/L YD 用于以下实验。

2.8 YD 对 H/R 损伤诱导的 AC-16 细胞的 LDH 渗漏的影响 检测 LDH 含量以评估细胞膜的完整性。结果表明, 200 mg/L 的 YD 能减少 H/R 损伤诱导的 AC-16 细胞的 LDH 渗漏, $P < 0.05$ 。见图 6B。

2.9 YD 对 H/R 损伤诱导的 AC-16 细胞增殖的影响

光镜观察 YD 对 H/R 损伤的 AC-16 细胞的增殖情况的影响。结果显示, 与对照组相比, H/R 损伤明显抑制细胞增殖, 200 mg/L 的 YD 可减轻这一现象。见图 7。

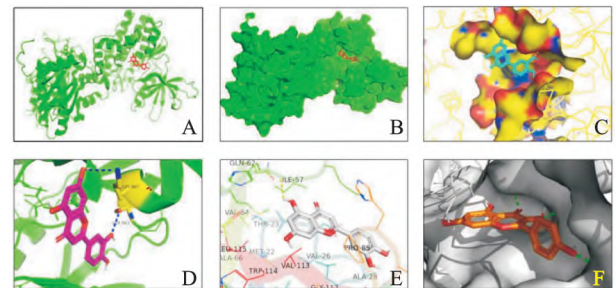


图5 分子对接图

A-D: STAT3 和木犀草素对接模式; E: VEGFA 和木犀草素对接模式; F: PIK3CA 和山柰酚对接模式

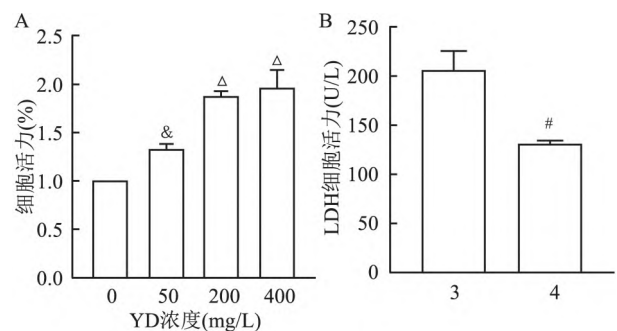
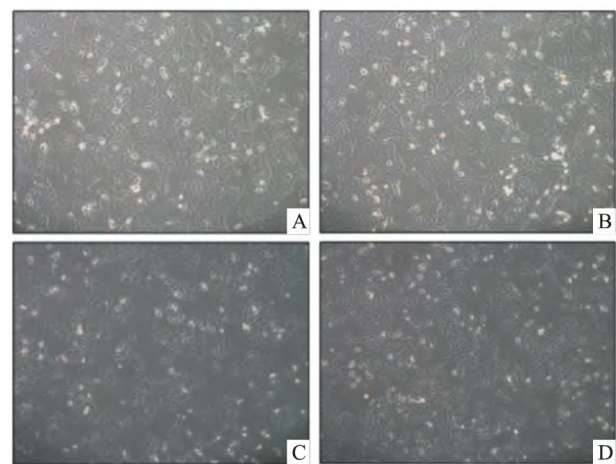


图6 YD 对 H/R 损伤诱导的 AC-16 细胞活力、LDH 渗漏的影响

A: 不同浓度 YD 对 H/R 损伤诱导的 AC-16 细胞的活力的影响; B: 200 mg/L 的 YD 对 H/R 损伤诱导的 AC-16 细胞 LDH 渗漏的影响; 3: H/R 组; 4: H/R + YD 组; 与 0 mg/L 组比较: $^{\&}P < 0.05$; 与 50 mg/L 组比较: $^{\Delta}P < 0.05$; 与 3 组相比: $^{\#}P < 0.05$

图7 YD 对 H/R 损伤诱导的 AC-16 细胞增殖的影响 $\times 100$

A: Control 组; B: YD 组; C: H/R 组; D: H/R + YD 组

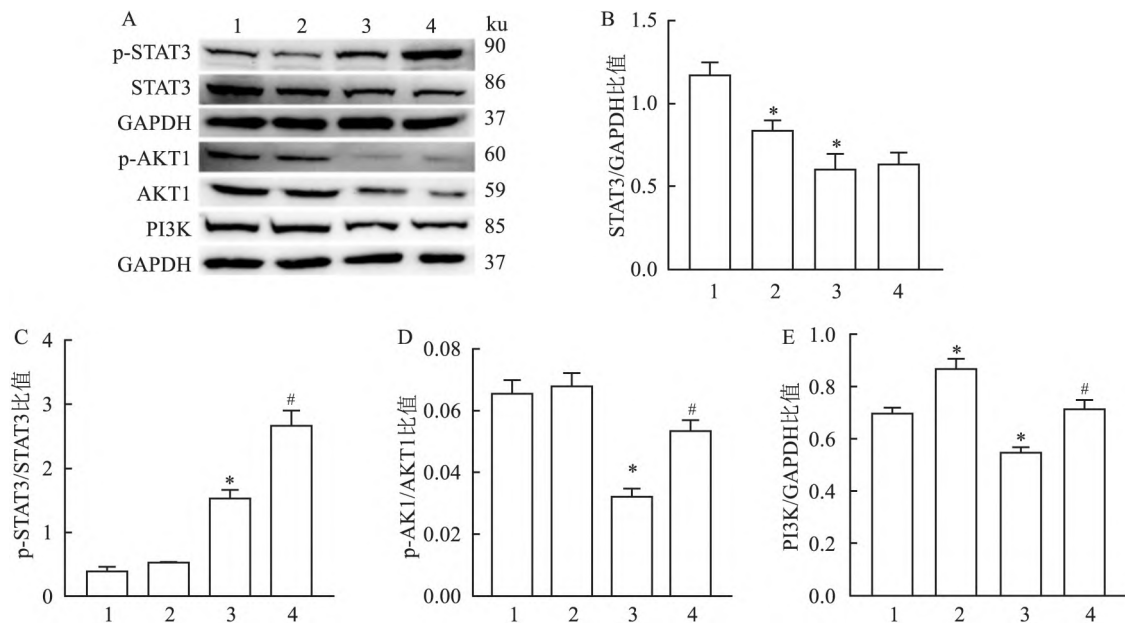


图8 YD对AC-16细胞STAT3、p-STAT3、PI3K、Akt1、p-Akt1蛋白表达的影响

A: Western blot 检测各组细胞蛋白表达水平; B: STAT3 蛋白表达水平; C: p-STAT3 蛋白表达水平; D: PI3K 蛋白表达水平; E: p-Akt1 蛋白表达水平; 1: control 组; 2: YD 组; 3: H/R 组; 4: H/R + YD 组; 与 Control 组比较: * $P < 0.05$; 与 H/R 组比较: # $P < 0.05$

2.10 YD对AC-16细胞STAT3、p-STAT3、PI3K、AKT1、p-AKT1蛋白表达的影响 结果显示,在无H/R诱导情况下,加药组STAT3表达较未加药组降低;H/R诱导后,H/R损伤可导致STAT3水平降低,加药组与未加药组未见明显差异,见图8B。在无H/R诱导的情况下,加药组对STAT3磷酸化水平无明显影响,H/R损伤可以刺激STAT3磷酸化,在H/R诱导情况下,YD可以促进STAT3磷酸化水平,见图8C。在无H/R损伤诱导情况下,加药组与未加药组未见明显差异;H/R诱导可抑制Akt1磷酸化水平,200 mg/L YD能逆转这一现象,促进p-Akt1表达,见图8D。在无H/R诱导情况下,加药组PI3K表达增加;H/R诱导后,加药组PI3K表达明显降低;200 mg/L YD能逆转这一现象,促进PI3K表达,见图8E。

3 讨论

MIRI是CHD病理生理过程中加重心肌组织进一步损伤的重要机制。再灌注期间,大量氧自由基生成引起氧化应激反应,白细胞激活,释放大量促炎因子,导致心肌缺血缺氧损伤进一步加重。YD应用于临床多年,疗效安全确定,然而目前对该药的药理作用研究报告甚少,为了探究YD治疗MIRI的药理机制,该研究通过TCMSP数据库和文献检索对其主要活性成分筛选,匹配出对应基因,再与疾病基因

映射,最终得到该药物作用于MIRI的关键靶点和通路。

虽然在TCMSP数据库中没有筛选出大蒜和艾片的活性成分,但大量文献资料报道了大蒜及艾片治疗心血管疾病药效明确。艾片具有抗炎、抗氧化作用^[6],药理学研究表明,艾片对改善大鼠急性心肌梗死(acute myocardial infarction, AMI)药效明显优于天然冰片和合成冰片,且无明显量效关系^[7]。大蒜辣素能抑制心肌梗死后大鼠的心肌纤维化^[8],大蒜素可以抑制自噬,减轻心肌肥大,抑制心室重塑^[9];蒜氨酸具有调节血脂和抗氧化的作用^[10]。因此该研究增加了艾片中的4种活性成分以及大蒜中的大蒜素、大蒜精油、蒜氨酸和大蒜辣素。而在药物-靶点网络中也证实艾片中的 α -蒎烯和左旋龙脑与核心靶点中的细胞色素P450c17 α (CYP17A1)相互映射。

对PPI网络中筛选得到的重要靶标进行分析。其中度值位居第一的Akt1是影响心肌细胞活性与功能的主要决定因素之一,激活Akt1可以调控下游的因子影响细胞的增殖、凋亡、自噬等过程^[11];传导与转录激活因子3(signal transducer and activator of transcription 3, STAT3)在多种心血管疾病的病理生理过程中发挥重要调节作用。研究^[12]表明,激活STAT3可降低心肌梗塞大鼠模型的梗塞面积。该研究中表明,YD能减轻H/R诱导的AC-16心肌细胞

损伤,增加细胞活力,减少 LDH 渗漏。其机制与 PI3K-AKT1 和 STAT3 信号通路有关。

对 160 个共同靶点进行富集分析显示,YD 主要通过流体剪应力与动脉粥样硬化、TRP 通道的炎性介质调节、脂肪细胞脂解调节、血小板活化、钙信号通路、PPAR 受体信号通路发挥抗 MIRI 的作用。流体剪应力能与 TNF- α 协同作用,促进内皮细胞自噬,加速内皮细胞的脱落^[13],加快 AS 的进程。钙信号通路参与心肌细胞的增殖、凋亡过程,调节钙信号通能减轻细胞内钙超载,保护心肌缺血再灌注损伤^[14]。过氧化物酶体增殖物激活受体(peroxisome proliferators-activated receptors, PPARs) 参与脂质氧化和细胞增殖过程,激动 PPAR 信号通路能使 caspase 蛋白表达下调,保护心肌细胞^[15]。

综上所述,YD 治疗 MIRI 是多成分-多靶点-多通路协同作用的结果。该研究从多个角度对其潜在作用靶点及分子机制进行预测,并从细胞水平、蛋白水平进行验证,为后续实验提供新的探索思路,也为该药物应用于临床提供理论依据。

参考文献

- [1] Zhou M, Wang H, Zeng X, et al. Mortality, morbidity, and risk factors in China and its provinces, 1990–2017: a systematic analysis for the global burden of disease study 2017 [J]. Lancet, 2019, 394(10204): 1145–58.
- [2] Zhao D, Liu J, Wang M, et al. Epidemiology of cardiovascular disease in China: current features and implications [J]. Nat Rev Cardiol, 2019, 16(4): 203–12.
- [3] 黄艳红,刘德泉,由秀,等.银丹心脑通软胶囊对 2 型糖尿病合并慢性心力衰竭患者血液流变学及心功能的影响 [J]. 现代中西医结合杂志, 2016, 25(19): 2115–7.
- [4] 黄培红,林焕锋,周宁智,等.银丹心脑通软胶囊对气滞血瘀型冠心病病人运动耐量的影响 [J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2018, 16(10): 1390–1.
- [5] 马涛,闫红燕.银丹心脑通软胶囊对不稳定型心绞痛患者心率变异性的影响 [J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2012, 10(1): 18–9.
- [6] Madhuri K, Naik P R. Ameliorative effect of borneol, a natural bicyclic monoterpene against hyperglycemia, hyperlipidemia and oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic Wistar rats [J]. Biomed Pharmacother, 2017, 96(9): 336–47.
- [7] 樊亚梅,王立映,王建,等.3 种冰片防治给药对 AMI 模型大鼠的心肌保护作用 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(6): 64–72.
- [8] 李少春,马丽娜,陈坚,等.大蒜辣素对大鼠心肌梗死后纤维化的影响及与 TGF β /Smads 信号通路的关系 [J]. 中国中药杂志, 2016, 41(13): 2517–21.
- [9] Ba L, Gao J, Chen Y, et al. Allicin attenuates pathological cardiac hypertrophy by inhibiting autophagy via activation of PI3K/Akt/mTOR and MAPK/ERK/mTOR signaling pathways [J]. Phyto-medicine, 2019, 58(3): 152765.
- [10] 赵立,苟萍,王霞,等.大蒜活性物质对高脂小鼠血脂代谢的影响 [J]. 中成药, 2013, 35(1): 28–32.
- [11] Zheng Y, Gu S, Li X, et al. Berberine postconditioning protects the heart from ischemia/reperfusion injury through modulation of autophagy [J]. Cell Death Dis, 2017, 8(2): e2577.
- [12] Ma H, Gong H, Chen Z D, et al. Association of Stat3 with HSFI plays a critical role in G-CSF- induced cardio-protection against ischemia/reperfusion injury [J]. J Mol Cell Cardiol, 2012, 52(6): 1282–90.
- [13] Feng Y, Cheng J, Wei B, et al. CaMKII inhibition reduces isoproterenol-induced ischemia and arrhythmias in hypertrophic mice [J]. Oncotarget, 2017, 8(11): 17504–9.
- [14] 陈钰,刘晓秋,郭丽丽,等.中药在心肌细胞钙信号转导通路研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(18): 319–22.
- [15] 许敬平,吴大为,滕旭,等. PPAR γ 激动剂吡格列酮对大鼠心肌缺血再灌注心肌细胞凋亡的影响 [J]. 山西医科大学学报, 2018, 49(7): 754–7.

Network pharmacological analysis and experimental verification of the mechanism of Yindan Xinnaotong in protecting myocardial ischemia-reperfusion injury

Xu Qili¹, Zou Changchao², Mo Lili¹, Zhou Haiyan¹, Liu Xingde^{1,2}

(¹Dept of Cardiology, Affiliated Hospital of Guizhou Medical University, Guiyang 550000; ²Dept of Cardiology, Second Affiliated Hospital of Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550000)

Abstract Objective To explore the material basis and mechanism of Yindan Xinnaotong soft capsule (YD) in treating myocardial ischemia-reperfusion injury (MIRI) based on network pharmacology, so as to provide theoretical reference for the treatment of MIRI. **Methods** The main active components and action targets of YD were searched by TCMSP, SwissTargetPrediction and China knowledge Network. The disease targets of MIRI were

网络出版时间:2021/12/22 17:00 网络出版地址:https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.r.20211221.1001.027.html

慢性炎性疼痛对小鼠肠道菌群的影响

王小敏,徐 鹏,王侯棋,曾建业,周思宸,邢承志,胡翔宇,吴亚男,张映若,范红结

摘要 目的 探究慢性炎性疼痛对小鼠肠道菌群多样性和结构的影响。方法 选取 SPF 级雌性 C57BL/6J 小鼠 12 只,随机分为 CFA 组和 Mock 组,每组 6 只;Mock 组右后足底皮下注射 50 μ l 的 0.9% 氯化钠溶液,CFA 组右后足底皮下注射 50 μ l 的 CFA 作为慢性炎性疼痛模型组。2 周后,安乐死小鼠,解剖后取结肠内粪便,组内两只小鼠结肠内粪便进行混样,采用 16S rRNA 高通量基因测序技术检测分析肠道菌群多样性和结构。结果 两组小鼠在肠道菌群构成上差异明显。与 Mock 组相比,CFA 组肠道菌群丰富度及多样性降低;门水平上,厚壁菌门和 TM7 丰度升高;科、属水平上,气球菌属、乳酸杆菌属和脱硫弧菌属丰度显著升高,嗜冷杆菌属、普雷沃氏菌属、颤螺菌属和双歧杆菌属丰度明显降低;从门到属主要分类等级上,发现的生物标志物较多。

结论 慢性炎性疼痛的小鼠肠道菌群结构尤其是优势菌群结构发生了明显变化,这些数据可为慢性炎性疼痛导致的微生态失衡的治疗及通过“肠-脑轴”改善患者消极情绪提供依据。

关键词 高通量测序;慢性炎性疼痛;肠道菌群;多样性

中图分类号 R 372

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2022)01-0138-06
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.01.026

疼痛是临床最常见的症状之一,炎性疼痛又是最重要的疼痛类型^[1]。炎性疼痛是由创伤、感染等各种因素造成的炎症所诱发的疼痛,是最常见的临床疼痛类型,正成为全球健康问题之一。此外,疼痛敏感和消极情绪之间存在着相互促进作用,现有的治疗方法并不能消除慢性疼痛患者的消极情绪和抱怨^[2]。肠道定居着数量庞大的微生物群,是人体最复杂的“微生态系统”,影响着人体健康^[3]。然而,至今很少有研究探讨肠道菌群在慢性炎性疼痛中的作用。弗氏完全佐剂(complete freund's adjuvant, CFA)常被用于构建慢性炎性疼痛模型。该研究基于 CFA 构建 C57BL/6J 小鼠慢性炎性疼痛模型,从小鼠结肠内粪便样本菌群的角度间接探讨慢性炎性

2021-09-29 接收

基金项目:国家自然科学基金地区科学基金项目(编号:31860706);
贵州省卫生计生委科学技术基金项目(编号:Gzwjkj2018-1-011);遵义医科大学大学生创新创业训练计划(编号:ZYDC2019010);2018 年度贵州省高层次创新型人才(编号:CJ-991)

作者单位:遵义医科大学基础医学院微生物学教研室,遵义 563000

作者简介:王小敏,女,博士,副教授,责任作者, E-mail: WXM_ZMU@163.com

screened by GeneCards database. The “drug-component-disease-target” network relationship was constructed by Cytoscape software, enrichment analysis and prediction mechanism were analyzed, and the molecular docking verification was carried out between the top three main active components and the top six targets in PPI network. Human myocardial AC-16 cells were constructed hypoxia/reoxygenation (H/R) model to initially verify the core target. Using CCK-8 assay was used to detect cell viability and explore the optimal drug concentration. The influence of YD on cell morphology was observed by using optical microscope. LDH content was detected to assess the integrity of cell membrane; Western blot was used to detect the expression of STAT3, p-STAT3, PI3K, AKT1 and p-AKT1. **Results** A total of 105 active components, 382 drug targets, 1223 MIRI disease targets and 160 drug-disease common targets of YD were obtained. The key targets involved AKT1, STAT3, VEGFA, TNF, MAPK8, PIK3CA and so on. GO analysis mainly involved apoptosis, lipolysis, muscle cell proliferation, cytokine-mediated inflammation, oxidative stress and so on. The results of molecular docking showed that VEGFA, APP and PIK3CA could bind to quercetin, luteolin and kaempferol. Our results showed that 200 mg/L YD could significantly promote the proliferation of AC-16 cells and reduce LDH leakage. Western blot results showed that YD could activate STAT3 and PI3K-AKT1 signaling pathways and protect myocardium. **Conclusion** YD can protect MIRI through multi-components, multi-targets and multi-pathways.

Key words Yindan Xinnatong; MIRI; network pharmacology; molecular docking; quercetin; luteolin; kaempferol