

基于网络药理学及分子对接探讨黄芪对心肌缺血损伤的作用机制

钱颖蕾 梁子杰 李嘉伟 朱文彬 陈莹莹

广西中医药大学赛恩斯新医药学院, 广西壮族自治区南宁市, 530222;

摘要: 目的探讨黄芪对心肌缺血损伤的作用机制。方法在 TCSP 和 OMIM 数据库中筛选并删除重复值获得心肌缺血损伤发生发展相关靶点, 利用 Venny 在线分析工具获得黄芪抗心肌缺血损伤的潜在作用靶点, 通过 STRING 数据库构建共同靶点的蛋白质互作网络图, 利用 Cytoscape 3.9.0 软件取得黄芪治疗心肌缺血损伤的核心靶点, 再 R 软件和相关的 R 包进行 GO 和 KEGG 富集分析并通过 AutoDock Tools 进行分子对接模拟。结果筛选黄芪治疗心肌缺血损伤的 20 个活性成分和 215 个潜在作用靶点。PPI 筛选得到关键靶点 TNF、AKT1、TP53、IL6、EGFR。通过 GO 功能分析后, 发现生物过程主要集中在伤口愈合、氧化应激反应和对肽的反应等, KEGG 通路富集分析显示涉及 PI3K/AKT 信号通路和 MAPK 信号通路等。分子对接结果显示 7-O-甲基异微凸剑叶莎醇、芒柄花黄素和异鼠李素与关键靶点具有良好的结合活性。结论黄芪可通过多靶点、多通路协同治疗心肌缺血损伤。

关键词: 黄芪; 心肌缺血; 网络药理学; 分子对接

DOI: 10.69979/3029-2808.25.03.034

前言

心肌缺血损伤是由于心脏冠状动脉血流减少或中断, 导致心肌供氧不足而引起的组织损伤, 损伤的持续发展, 可能引发心肌梗死、心力衰竭等严重并发症或缺血性心脏病^[1]等心血管疾病。黄芪, 古称黄耆, 最早记载在《神农本草经》中, 味甘, 性微温, 可补气升阳、养津生血^[2]。网络药理学通过有效预测疾病靶点, 可从分子水平反应药物对疾病的作用机制。本研究基于网络药理学整合分析与分子对接技术, 多维度解析黄芪对心肌缺血损伤的作用机制, 为黄芪治疗更多心血管疾病提供理论依据。

1 实验方法

1.1 黄芪成分和靶点信息收集

使用 TCSP 网络数据平台, 以“Huangqi”为关键词进行检索, 将筛选条件限定为: OB \geq 30%且 DL \geq 0.18, 获取黄芪的有效成分及对应的靶点。将获取的靶点蛋白用 UniProt^[3] 蛋白标准化数据库进行标准化, 限定物种为“Homo sapiens”, 最终去除重复靶点, 得到黄芪的作用靶点。

1.2 心肌缺血损伤相关靶点预测

在 OMIM 数据库中和 GeneCards 数据库以“Myocar

dial ischemic injury”作为关键词进行检索, 将所得到的靶点根据 Score 值进行排序, Score 值越高代表靶点与疾病越相关。因此, 选用 Score \geq 5 为阈值筛选靶点, 合并 2 个疾病数据库靶点后, 删除重复值得到与心肌缺血损伤发生发展相关靶点。

1.3 交集靶点及药物-靶点-疾病网络的构建

整理黄芪药物靶点和心肌缺血损伤疾病靶点, 利用 Venny 2.1.0 在线分析工具获取黄芪抗心肌缺血损伤的潜在作用靶点。将交集靶点数据归纳整理, 利用 Cytoscape 3.9.0 软件将结果可视化, 并构建“药物成分-靶点-疾病”网络。最后利用 CytoNCA 插件计算 Degree 值排序筛选药物核心成分^[4]。

1.4 蛋白互作网络构建

将交集靶点导入 STRING 数据库构建 PPI 网络, 在“Multiple proteins”中输入靶点基因, Organism 选择“Homo sapiens”, 设置最低相互作用阈值为“high confidence (0.700)”, 隐形游离节点, 显现蛋白质相互作用关系。

1.5 筛选核心靶点

将 2.4 获得的 TSV 结果文件导入 Cytoscape 3.9.0 软件, 利用软件中的 CytoNCA 插件对网络图进行拓扑分

析^[5], Degree 值排名前 5 的交集靶点为黄芪治疗心肌缺血损伤的核心靶点。

1.6 GO 和 KEGG 富集分析

为了完整地分析共有靶点基因的基本功能和通过路径,使用 R 3.6.3 软件和相关的 R 包(clusterProfiler、Org.Hs.eg.db 和 ggplot2) 进行基因本体(Gene Ontology, GO)和京都基因与基因组百科全书(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG)富集分析,设定阈值 $P.adjust < 0.05$ 。分别按照生物过程、分子功能和细胞组分富集的显著程度取排名前 5 的项目绘制柱状图,选择排名前 20 的 KEGG 通路绘制气泡图。

1.7 分子对接验证

在 RCSB PDB 数据库^[6]中下载关键蛋白靶点,用 PyMOL 对原 PDB 蛋白分子进行处理,使用 AutoDock Tools 进行分子对接,选取合适的构象,并用 PyMOL 作 3D 结合模式图。

2 实验结果

2.1 黄芪活性成分和潜在靶点的筛选

通过 TCSP 数据库筛选出 20 个可能具有高效的活性成分。将所有成分的潜在靶点汇总并去重共获得黄芪作用靶点 215 个。

2.2 心肌缺血损伤作用靶点

通过 OMIM 数据库和 GeneCards 数据库分别获得心肌缺血损伤的靶点数目 50 个和 977 个。将两个数据库的靶点汇总保留有效数据共得到疾病靶点 1007 个。

2.3 交集靶点及药物-靶点-疾病网络的构建

运用 Venny 在线分析工具,将 215 个黄芪潜在靶点和 1007 个白血病相关疾病潜在靶点导入,得到 118 个黄芪-心肌缺血损伤的交集靶点,并找到共同靶点相对应的活性成分共 14 个。将这些成分和靶点信息全部导入 Cytoscape 3.9.0 软件,构建药物-靶点-疾病网络,其中按 Degree 值从高到低前 5 的化合物分别为槲皮素(quercetin)、山奈酚(kaempferol)、7-O-甲基异微凸剑叶莎醇(7-O-methylisomucronulatol)、芒柄花黄素(formononetin)和异鼠李素(isorhamnetin)。degree 值越高成分越重要,度值较高的化合物可能为黄芪治疗心肌缺血的主要化合物。

2.4 蛋白互作网络

将 118 个共同作用靶点导入 STRING 数据库,得到蛋白质互相作用的结果。在 Cytoscape 3.9.0 软件上构建 PPI 网络,其中 Degree 值决定节点面积大小及颜色深浅,节点面积越大颜色越深代表此蛋白在该网络中所起的作用越大(图 1)。

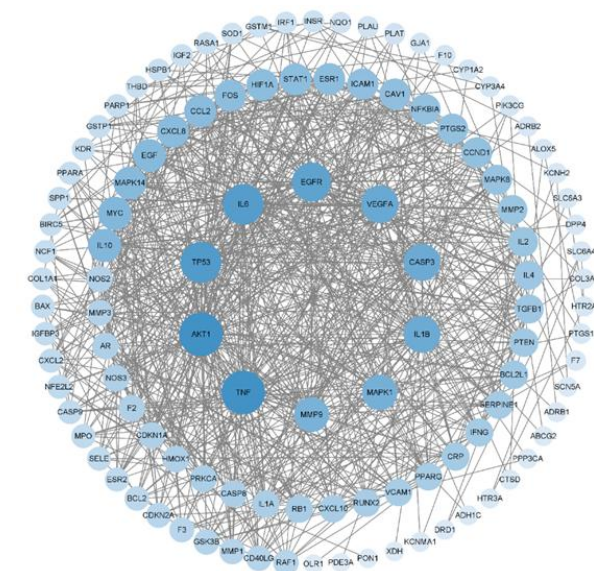


图 1 基于 Cytoscape 软件的 PPI 网络图

2.5 筛选核心靶点

将 STRING 数据库获得的 TSV 格式文件导入 Cytoscape 3.9.0 软件,利用网络拓扑分析 CytoNCA 插件以 Degree 值选取排名前 5 的靶点作为核心靶点,分别为 TNF、AKT、TP53、IL6 和 EGFR。以上结果表明,所得到的 5 个靶点可能为黄芪治疗心肌缺血损伤的主要靶点。

2.6 GO 和 KEGG 富集分析

为了研究黄芪治疗心肌缺血的作用原理,用 R 软件使用 GO 和 KEGG 的方法对 118 个潜在靶点富集分析,设置 $P.adjust < 0.05$ 为筛选条件。GO 富集分析结果包括 2290 个生物过程、60 个细胞组成和 135 个分子功能条目,分别选取 Count 数排名前 5 的条目绘制 GO 功能分析柱状图(图 2)。在生物过程中,涉猎在伤口愈合、氧化应激反应和对肽的反应等。在细胞组成中,涉猎到膜筏、膜微域和质膜的外侧等。在分子功能中,涉猎到受体配体活性、信号受体激活活性和 DNA 转录因子结合等。KEGG 通路富集分析结果显示 118 个靶点与 162 条信号通路相关,选取 Count 数排名前 20 的信号通路绘制气泡图(图 3)。图中可见靶点主要富集在 AGE-EAG E 信号通路、PI3K/AKT 信号通路和 MAPK 信号通路等。

柱状图纵坐标表示富集该生物过程的靶点数目, 富集数目越多表明其在黄芪治疗心肌缺血损伤的过程中越重要。气泡图中气泡越大、颜色越深, 表明富集的靶点越多、富集程度越显著。以上均提示黄芪可通过参与调控多种生物学过程的多条通路来发挥对心肌缺血损伤发挥治疗作用。

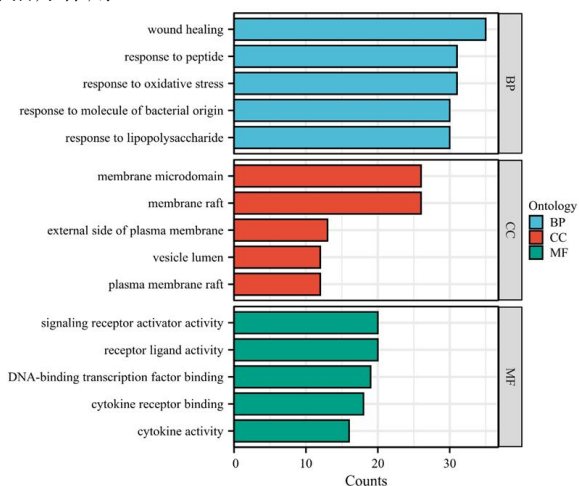


图 2 GO 富集分析

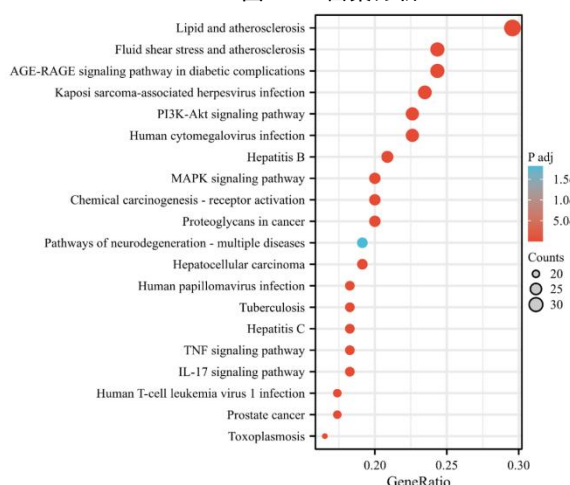
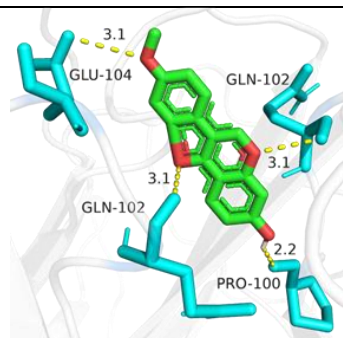


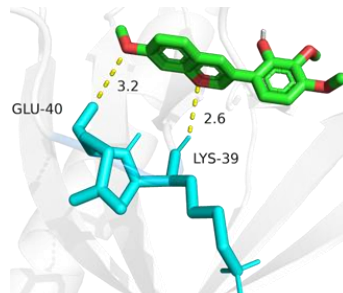
图 3 KEGG 富集分析

2.7 分子对接

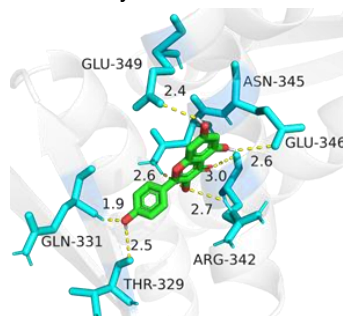
在 RCSB PDB 数据库中下载肿瘤坏死因子、RAC- α 丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶、细胞肿瘤抗原 p53、白细胞介素-6 和表皮生长因子受体, 使用 AutoDock Tools 进行分子对接, 结果显示 formononetin、7-O-methylisomucronulatol 及 kaempferol 与 TNF、AKT、TP53、IL6 及 EGFR 的最低结合能均小于 $-5 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$ [7], 表明药物分子与关键蛋白间具有亲和力, 可形成稳定结构。



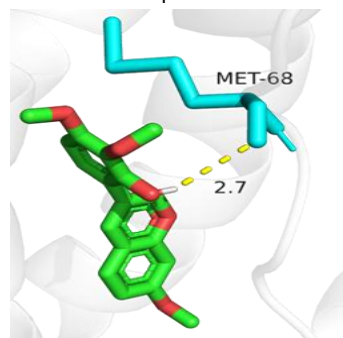
formononetin-TNF



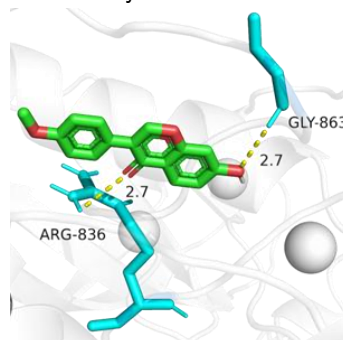
7-O-methylisomucronulatol-AKT1



kaempferol-TP53



7-O-methylisomucronulatol-IL6



formononetin-EGFR

图 4 分子对接示意图

3 讨论

黄芪一直是治疗心血管疾病的重要中药,其主要活性成分具有消炎、抗癌、抑菌等药理作用,可有效减少细胞凋亡,改善心肌缺血损伤^[8-10]。本研究使用网络药理学及分子对接技术从黄芪中筛选到可能作用于心肌缺血损伤的成分槲皮素、山奈酚、7-O-甲基异微凸剑叶莎醇、芒柄花黄素和异鼠李素,证明异 7-O-甲基异微凸剑叶莎醇、芒柄花黄素和异鼠李素与相关蛋白靶点具有良好的结合能力。黄芪可通过调控 PI3K/AKT 信号通路和 MAPK 信号通路,调节心肌细胞衰老进程、自噬-凋亡动态平衡及缺血微环境稳态,改善心肌缺血的炎症反应和氧化应激,促进心肌组织修复与内源性再生潜能^[11]。现代临床实验表明,以黄芪为主导的相关复方在治疗心肌缺血损伤的黄芪可有效降低心肌缺血及再灌注损伤,改善心脏功能^[12]。

综上所述,黄芪可通过多靶点、多通路的协同作用治疗心肌缺血损伤,为使用黄芪治疗更多新型心血管疾病提供理论支持,尽管网络药理学为中药多靶点机制解析提供了高效策略,但目前仍存在局限性^[13],后期仍需大量实验加以验证。

参考文献

[1]ALGOET M, JANSSENS S, HIMMELREICH U, et al. Myocardial ischemia-reperfusion injury and the influence of inflammation[J]. Trends Cardiovasc Med, 2023, 33(6): 357-366.

[2]张成园, 朱昕宇, 翟婷, 等. 黄芪治疗帕金森病机制的研究进展[J]. 华西药学杂志, 2024, 39(05): 611-616.

[3]UniProt Consortium. UniProt: the universal protein knowledgebase in 2023[J]. Nucleic Acids Res., 2023, 51(D1): D523-D531.

[4]符丹丹, 邵鑫源, 张琦, 等. 基于网络药理学及分子对接探讨白桦茸防治阿尔兹海默病的潜在作用机制[J/OL]. 食品与发酵工业, 1-12[2025-03-21].

[5]Chin CH, Chen SH, Wu H, et al. Identifying hub objects and sub-networks from complex interactome [J]. BMC Syst Biol, 2014, 8 Suppl 4(Suppl 4): S11.

[6]Takacs K, Varga B, Grolmusz V. An extended live amyloid structure list from the PDB [J]. Febs Open Bio, 2019, 9(1): 185-90.

[7]洪卫漫, 袁晨宜, 郝芮, 等. 基于网络药理学及分子对接探讨 BBH 治疗白癫风的作用机制[J]. 江西科技师范大学学报, 2024, (06): 52-55.

[8]周明杰, 刘立群. 山奈酚预处理对大鼠心脏缺血再灌注损伤的影响[J]. 潍坊医学院学报, 2015, 37(03): 168-170+179.

[9]张丙义, 郭素芬, 刘海涛. 鼠李黄素对心肌缺血再灌注大鼠心脏功能和免疫反应的调节作用[J]. 中国现代应用药学, 2020, 37(03): 314-320.

[10]刘海瑞, 叶麟晰, 林佳美慧, 等. 芒柄花黄素通过上调 GPER 激活 PI3K/Akt/e NOS 信号通路减轻心肌缺血再灌注后无复流的作用及机制研究[J]. 药学学报, 2023, 58(06): 1496-1504.

[11]刘洋, 贾孟晓, 赵婷, 等. 基于 UPLC-Q-Exactive Orbitrap-MS 和网络药理学的芪参益气滴丸治疗心肌缺血的配伍机制研究[J]. 中国中药杂志, 2024, 49(14): 3769-3783.

[12]田苗艳, 徐丹, 宋炜, 等. 黄芪桂枝五物汤对急性心肌梗死病人心室重塑及血清 miR-21、miR-126 水平的影响[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2024, 22(04): 686-690.

[13]任秀秀, 李政. 基于网络药理学探讨中药防治结直肠癌的研究进展[J]. 中医临床研究, 2025, 17(01): 95-100.

作者简介: 钱颖蕾 (2002. 11. 19), 女, 汉族, 广东广宁, 研究方向: 中医学

项目来源: 广西中医药大学赛恩斯新医药学院大学生创新创业训练项目 (自治区级), 项目编号 S202313643012