

基于网络药理学和体外实验探讨冠心宁注射液 改善心肌肥厚的作用

申晶^{1,2}, 苗俊秋^{1,3}, 王德平^{1,2}, 石建云^{1,2}, 左琳^{1,2}, 封启龙^{1,2}, 曹济民^{1,2*}

(1. 山西医科大学 基础医学院, 山西 太原 030001;

2. 细胞生理学教育部重点实验室, 山西 太原 030001;

3. 山西医科大学 药学院, 山西 太原 030001)

摘要: 本文采用网络药理学方法, 对冠心宁(Guanxinning, GXN)注射液改善心肌肥厚的关键靶点及作用机制进行探讨, 并在细胞水平上进行验证。首先, 利用中药系统药理学数据库分析平台(Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology Database and Analysis Platform, TCMSP)对GXN注射液活性成分进行筛选, 并结合BATMAN-TCM、Swiss Target Prediction、OMIM、GeneCards和DisGeNet数据库分析其改善心肌肥厚的潜在靶点。通过String数据库和Cytoscape 3.9.1软件构建潜在靶点间相互作用网络图并筛选核心靶点。将核心靶点输入Metascape数据库进行基因本体论(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, 探索GXN抗心肌肥厚的潜在机制。其次, 采用Autodock平台进行分子对接, 预测活性成分与关键靶点的结合度。最后, 在细胞水平上对GXN注射液改善心肌肥厚的作用机制进行验证。网络药理学筛选得到GXN注射液活性成分68个, GXN注射液改善心肌肥厚的关键靶点100个, 主要通路包括MAPK信号通路、JAK-STAT信号通路、钙信号通路等。分子对接结果显示GXN注射液活性成分新隐丹参酮、米尔顿酮和脱氧隐丹参酮与MAPK1、SRC和MAPK3对接较为稳定。细胞实验结果显示, GXN可通过MAPK信号通路抑制心肌细胞肥大。本研究表明GXN注射液改善心肌肥厚具有多成分、多靶点和多途径的特点。

关键词: 网络药理学; 分子对接; 冠心宁注射液; 心肌肥厚; MAPK信号通路

中图分类号: R282 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2395(2025)06-1251-12

Mechanism of Guanxinning Injection in Improvement of Cardiac Hypertrophy Based on Network Pharmacology and *in vitro* Experiments

SHEN Jing^{1,2}, MIAO Junqiu^{1,3}, WANG Deping^{1,2}, SHI Jianyun^{1,2}, ZUO Lin^{1,2}, FENG Qilong^{1,2}, CAO Jimin^{1,2*}

(1. School of Basic Medicine, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China;

2. Key Laboratory of Cellular Physiology at Shanxi Medical University, Ministry of Education, Taiyuan 030001, China;

3. Department of Pharmacy, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China)

Abstract: This study aims to explore the targets and mechanism of Guanxinning (GXN) injection in the improvement of cardiac hypertrophy (CH) based on network pharmacology, and validate at the cellular level. Firstly, chemical constituents of GXN injection were collected through traditional chinese medicine systems pharmacology database and analysis platform (TCMSP) database. BAT-

收稿日期: 2023-10-29; **接受日期:** 2024-03-29

基金项目: 国家自然科学基金(82170523); 山西省基础研究计划青年基金(202103021223239)

作者简介: 申晶(1992-), 女, 山西运城人, 博士, 实验师, 研究方向为药物在心肌肥厚中的作用机制研究。E-mail: sydsh-enjing@126.com

* **通信作者:** 曹济民(CAO Jimin), E-mail: caojimin@sxmu.edu.cn

引文格式: 申晶, 苗俊秋, 王德平, 等. 基于网络药理学和体外实验探讨冠心宁注射液改善心肌肥厚的作用[J]. 山西大学学报(自然科学版), 2025, 48(6): 1251-1262. DOI: 10.13451/j.sxu.ns.2024070.

MAN-TCM、Swiss Target Prediction, OMIM, GeneCards and DisGeNet database were used to analyze the targets of GXN injection for improvement of CH. The protein interaction network was obtained by the String database, and Cytoscape 3.9.1 was used to screen core targets. Gene ontology (GO) analysis and (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) pathway enrichment analysis of core target genes were performed using Metascape database to explore the potential mechanism of GXN in improving CH. Secondly, molecular docking study was performed to predict the binding affinity of the main active ingredients to the core targets. Finally, the mechanism of GXN injection-induced improvement in CH was verified at the cellular level. The network pharmacologic analysis showed that there was a total of 68 active ingredients and 100 core anti-CH targets in GXN injection. These core targets were mainly enriched in MAPK signaling pathway, JAK-STAT signaling pathway, calcium signaling pathway and so on. The molecular docking results indicated that neocryptotanshinone II, miltionone I and deoxyneocryptotanshinone showed the highest affinity with MAPK1, SRC and MAPK3, respectively. Experimental results showed that GXN inhibited cardiomyocyte hypertrophy through the MAPK signaling pathway. Therefore, GXN injection could protect against CH *via* a multi-component and multi-target way.

Key words: network pharmacology; molecular docking; Guanxinning injection; cardiac hypertrophy; MAPK signaling pathway

0 引言

近年来,我国心血管病的发病率与致死率仍高居榜首^[1]。心肌肥厚(cardiac hypertrophy, CH)是指由于左心室壁增厚或心室直径扩大引起的左心室质量增加。病理性心肌肥厚是由于长期高血压或瓣膜狭窄导致的压力超负荷,或者二尖瓣反流或主动脉瓣关闭不全、心肌梗死或遗传缺陷等导致的容量超负荷引起的,心肌组织发生代偿性增大^[2],是许多常见的心血管疾病如高血压、心肌梗死和动脉粥样硬化等引起的心脏结构学上的改变^[3]。如果不及时进行干预,在持续和长期的压力作用下代偿的心肌会出现适应不良,导致心力衰竭甚至猝死等严重后果。目前临床上治疗心肌肥厚的药物主要是血管紧张素转换酶抑制剂(Angiotensin Converting Enzyme Inhibitors, ACEI)和 β 肾上腺素受体阻滞剂(Angiotensin II Receptor Blocker, ARB)类药物,但由于其副反应多,疗效个体差异性大等问题,在临床上的使用率显著下降^[1]。因此,非常有必要寻找防治心肌肥厚的新的有效药物。

冠心宁(Guanxinning, GXN)注射液由丹参和川芎两味中药组成,具有通脉养心、活血化瘀的作用,目前在临床上主要用于冠心病、心绞痛患者的治疗,对于患者胸痛等症状具有辅助治疗作用。GXN中的丹参是心血管病治疗中的黄金草药,具有广泛的心脑血管保护作用,丹参及其成分可预防心肌梗塞、急性心肌缺血^[4]、心律失常、心脏肥大^[5]和心脏纤维化在内的多种心血管疾病;另一主要成分川

芎,是一种具有降低心血管疾病风险的巨大潜力的草药^[6],广泛应用于心力衰竭^[7]、高血压和冠心病^[8]等的治疗。然而, GXN改善心肌肥厚的药效作用机制尚不明确。

本研究采用网络药理学技术和分子对接技术,筛选出了GXN注射液改善心肌肥厚的成分基础和作用靶点,预测了GXN注射液改善心肌肥厚的相关信号通路,并利用体外心肌细胞肥大模型,验证了GXN注射液改善心肌肥厚的潜在作用及其机制。本研究为临床上应用GXN注射液改善心肌肥厚提供了实验依据和理论基础。

1 材料与方法

1.1 药物

冠心宁注射液(国药准字Z13020779,神威药业集团股份有限公司)。

1.2 试剂

H9C2细胞(购自武汉普诺赛生命科技有限公司),血管紧张素II(Angiotensin II, Ang II)(美国Sigma公司,批号:A9525),CCK-8试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司,货号C0038),逆转录试剂盒(日本TAKARA公司,货号RR037A),实时荧光定量聚合酶链式反应试剂盒(日本TAKARA公司,货号RR430B),引物购自上海生物工程股份有限公司,Western blotting所用化学试剂(美国AMRESCO公司), α -SMA抗体(美国abcam公司,货号ab5694),p-p38抗体(美国CST公司,货号4511T),p38抗体(美国CST公司,货号8690T),p-JNK1/2抗

体(美国 CST 公司,货号 4668T), JNK1/2 抗体(美国 CST 公司,货号 9252T), p-ERK1/2 抗体(美国 CST 公司,货号 4370T), ERK1/2 抗体(美国 CST 公司,货号 4695T)。

1.3 仪器

荧光显微镜(日本 Nikon 公司,型号 TS2R-FL), 超高灵敏度化学发光成像仪(美国 Biorad 公司,型号 ChemiDoc), 实时荧光定量 PCR 仪(美国 ThermoFisher 公司,型号 QuantStudio), 微量分光光度计(美国 Thermo 公司,型号 Nanodrop ONE), 基因扩增仪(德国 Eppendorf 公司,型号 5331), 冷冻离心机(美国 Beckman Coulter 公司,型号 Allegra X-15R)。

1.4 GXN 注射液活性成分的筛选以及潜在靶点的预测

利用中医药系统药理学数据库与分析平台(TCMSP, <https://old.tcm-sp-e.com/tcm-sp.php>)检索 GXN 注射液中“丹参”和“川芎”的化学成分,根据药物吸收、分布、代谢和排泄等药代动力学特性,以口服生物利用度(oral bioavailability, OB) $\geq 30\%$, 药物相似性(drug likeness, DL) ≥ 0.18 作为筛选标准,筛选活性成分。将活性成分,经由 TCMSP 数据库、BATMAN 数据库(<http://bionet.ncpsb.org.cn/batman-tcm>)和 Swiss Target Prediction 数据库(<http://www.swisstargetprediction.ch/>)预测其潜在作用的蛋白靶点,并将蛋白靶点输入至 Uniprot 蛋白质数据库(<https://www.uniprot.org>)中进行基因名转换。将不同数据库中获得蛋白靶点合并后删除重复信息,获得活性成分潜在的作用靶点。

1.5 疾病靶点的收集

以“cardiac hypertrophy”为关键词,在 OMIM 数据库(<https://www.omim.org/>)、GeneCards 数据库(<https://www.genecards.org/>)和 DisGeNET 数据库(<https://www.disgenet.org/>)(设定 Relevance score > 5)筛选与心肌肥厚相关的潜在靶点,删除数据库合并后的重复靶点,即为心肌肥厚疾病的相关靶点。

1.6 “药物-成分-疾病-靶点”网络模型的构建

将 GXN 注射液活性成分的潜在靶点与心肌肥厚相关靶点进行交集并绘制韦恩图,交集部分为药物-疾病共同靶点,即为 GXN 注射液

发挥抗心肌肥厚作用的潜在靶点。利用 Cytoscape 3.9.1 软件对 GXN 注射液活性成分和药物-疾病共同靶点进行映射,构建“药物-成分-靶点-疾病”网络模型。利用 Cytoscape 3.9.1 软件中 Network Analysis 功能进行网络拓扑结构分析,计算网络模型中各个活性成分的度值,筛选 GXN 注射液抗心肌肥厚的主要活性成分。

1.7 蛋白质相互作用(Protein-protein interaction, PPI)网络的构建以及关键基因的筛选

将 GXN 注射液发挥抗心肌肥厚作用的潜在靶点,输入到 String 数据库(<https://string-db.org/>)中进行 PPI 构建,设定物种为“Homo sapiens”,评分标准为大于 0.9,筛选存在高频度相互作用的靶点蛋白质,用 Cytoscape 3.9.1 软件进行可视化分析。利用 Cytoscape 软件中的 CentiScape 2.2 Men 插件,计算各节点的度值,度值表示与该节点直接作用的节点数量,度值越大说明该节点在网络中的重要性越大,设定度值大于 2 倍 the Avg. number of neighbors 的节点为关键靶点。

1.8 基因本体论(GO)和京都基因与基因组百科全书(KEGG)富集分析

将 GXN 注射液抗心肌肥厚作用的关键靶点输入 Metascape(<http://metascape.org/>)网站进行基因功能注释分析。设定参数:最小计数为 3、 $P < 0.01$ 、富集因子 > 1.5 ,筛选具有指导意义的生物学进程,并进行 GO 分析和 KEGG 通路分析。

1.9 活性成分与关键靶点的分子对接验证

将 GXN 注射液中活性排名前三的活性成分分别与 PPI 网络中度值排名前五的靶点蛋白进行分子对接。在 PubChem(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)数据库下载得到 GXN 注射液活性成分的 SDF 文件格式的 3D 结构信息,并通过 Open babel 软件将其转换为 pdb 格式。通过 PDB 数据库(<https://www.rcsb.org/>)获取靶点蛋白 pdb 格式的三维晶体结构,应用 AutoDockTool 4.0 软件对靶点蛋白进行去除水分子和加氢等处理,并将 GXN 注射液活性成分与预处理后的靶点蛋白进行分子对接,通过结合能评估活性成分与靶点蛋白的结合活性,将结合能较低的对接结果利用 PyMOL 软件进行可视化处理。

1.10 细胞培养以及心肌细胞肥大模型的构建

将 H9C2 心肌细胞系以 2×10^5 个/mL 的密度均匀接种于细胞培养板中。将细胞分为空白对照组 (Control 组)、模型组 (Ang II 组)、冠心宁组 (GXN 组)、GXN 和模型组 (GXN+Ang II 组)。H9C2 细胞加入无血清的 DMEM 高糖培养基饥饿 12 h, 加入 $1 \mu\text{mol/L}$ Ang II 及 $5 \mu\text{L/mL}$ 、 $10 \mu\text{L/mL}$ 和 $20 \mu\text{L/mL}$ 剂量的 GXN 注射液, 对照组则加入等体积的 PBS。24 h 后, 收集细胞。

1.11 心肌细胞表面积的计算

弃去 H9C2 细胞的培养基, 加入预冷的 PBS 清洗 3 次。质量浓度为 4% 多聚甲醛固定 20 min 后, 继续用 PBS 清洗除去残留的甲醛。加入体积分数 5% 山羊血清室温封闭 30 min 后, 加入一抗 $\alpha\text{-SMA}$ (1: 250), 4°C 冰箱过夜。PBS 清洗后加入荧光二抗 (1:200), 室温避光孵育 1 h; 弃去二抗, 用 PBS 清洗 3 次。避光滴加 DAPI 染核。在荧光显微镜下观察细胞形态, 每张片子随机选取 5 个视野进行拍照。

1.12 实时荧光定量 PCR (RT-qPCR)

收集处理后的 H9C2 细胞, 加入 Trizol 后提取总 RNA, 逆转成 cDNA 后, 使用以下引物进行实时荧光定量 PCR 反应:

rANP-F: CTGGGACCCCTCCGATAGAT, *rANP-R*: TTCGGTACCGGAAGCTGTTG; *rBNP-F*: CAATCCACGATGCAGAAGCTG, *rBNP-R*: GGCGCTGTCTTGAGACCTAA; *rGAPDH-F*: TCCCATTCTTCCACCTTTGA, *rGAPDH-R*: ATGTAGGCCATGAGGTCCAC。

1.13 蛋白免疫印迹法 (Western blotting, WB)

收集 H9C2 细胞, 提取总蛋白。将蛋白悬液用质量浓度为 10% SDS-PAGE 电泳分离, 转膜后用质量浓度为 5% 脱脂奶粉封闭 1 h, 之后加入一抗孵育过夜, TBS 洗膜后, 二抗室温孵育 1 h, 洗膜, 显影, 并运用 Image Lab 软件进行灰度分析。

1.14 统计学分析

数据采用 GraphPad Prism 软件进行统计学分析并绘图, 结果以均数 \pm 标准误 (Mean \pm SEM) 表示。两组之间的比较采用学生 t 检验分析; 三组以上的数据分析采用 one-way 方差分析 (ANOVA)。 $P < 0.05$ 被视为有统计学差异。

2 实验结果

2.1 GXN 注射液活性成分的筛选

通过 TCMSP 数据库以及文献检索, 对 GXN 注射液活性成分进行筛选, 删除无靶点成分, 共获得 68 个 $\text{OB} \geq 30\%$ 、 $\text{DL} \geq 0.18$ 的活性成分, 其中丹参含 61 个, 川芎含 7 个。利用 TCMSP 数据库、BATMAN 数据库和 SwissTarget 数据库, 对这 68 个活性成分进行预测, 得到 1 281 个靶点。

2.2 GXN 注射液改善心肌肥厚潜在靶点预测

利用 OMIM 数据库、GeneCards 数据库和 DisGeNET 数据库, 以“心肌肥厚”为搜索关键词, 检索心肌肥厚相关靶点。各数据库获得的结果合并后去除重复项, 共获得 2 972 个疾病靶点。

2.3 GXN 注射液抗心肌肥厚“药物-成分-疾病-靶点”网络模型的构建与分析

将上述的 1 281 个成分靶点与 2 972 个疾病靶点输入 Venny 2.1 软件绘制维恩图, 得到交集靶点 382 个, 即为 GXN 注射液改善心肌肥厚的潜在靶点 (图 1)。利用 Cytoscape 软件构建“药物-成分-靶点-疾病”网络模型。其中, 药物活性成分以 TCMSP 数据库中的“MOL”表示 (图 2)。利用 Cytoscape 3.9.1 软件中 Network Analysis 功能进行网络拓扑结构分析, 其中度值越大说明该节点在网络中的重要性越大。排名前三的活性成分为: 新隐丹参酮 (neocryptotanshinone II)、米尔顿酮 (miltionone I) 和脱氧隐丹参酮 (deoxyneocryptotanshinone)。

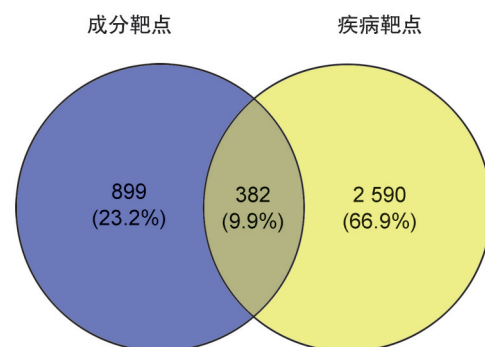
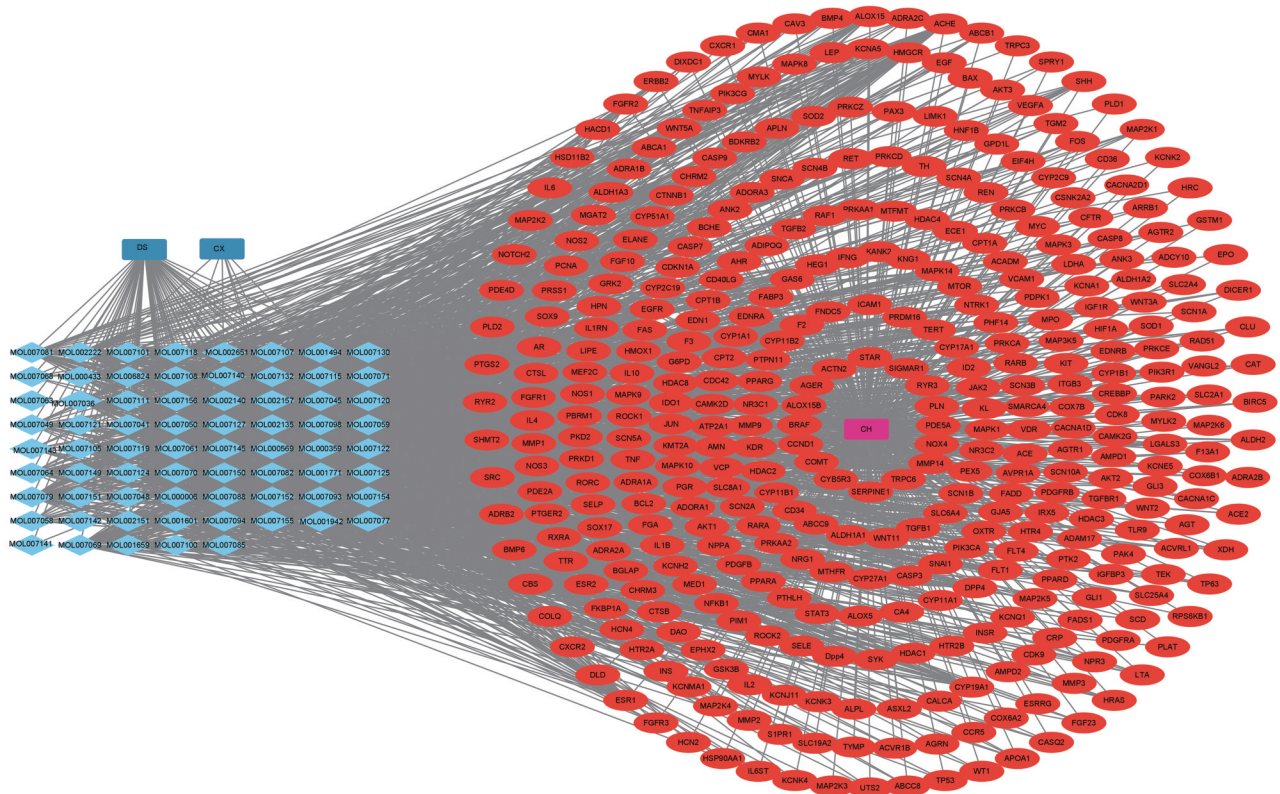


图 1 GXN 注射液成分靶点与心肌肥厚疾病基因交集的韦恩图

Fig. 1 Venn diagram of the intersection of GXN injection targets with cardiac hypertrophy-related genes



注:蓝色方框代表GXN注射液中的两种主要药物。浅蓝色菱形代表GXN注射液中的68个活性成分。红色椭圆代表382个交集靶点。粉色方框代表疾病。

Note: Blue box represents drugs. Light blue rhombus represents 68 active components in GXN injection. Red oval represents 382 common targets and pink box represents diseases.

图2 “药物-成分-靶点-疾病”网络图

Fig. 2 Network diagram of "drug-component-target-disease"

2.4 PPI网络模型的构建

将上述的382个交集靶点导入到String数据库中,进行PPI网络的构建,即可获得蛋白质相互作用关系。用Cytoscape 3.9.1软件将其可视化(图3)。由图3可见,该网络由310个节点和3478条边组成。

运用Network Analysis插件分析PPI网络的拓扑属性(表1)。以度值大于2倍the Avg. number of neighbors的节点为关键靶点,共筛选出100个关键靶点,其中度值排名前10位的靶点分别是SRC、STAT3、MAPK1、MAPK3、PIK3R1、PIK3CA、HRAS、CTNNB1、JUN和AKT1(图4)。

2.5 GO功能分析和KEGG通路分析

将筛选出的100个关键靶点输入Metascape数据库,进行GO功能分析和KEGG通路分析(图5)。结果显示,GXN注射液改善心肌肥厚的生物学过程(Biological Process, BP)主要集中在

在蛋白质磷酸化的正调节、蛋白质磷酸化、对激素的反应、细胞迁移的正向调节、MAPK级联和平滑肌细胞迁移的调节等(图5)。分子功能(Molecular Function, MF)集中在蛋白激酶活性、激酶活性、蛋白酪氨酸激酶活性、转录共调节子结合、磷酸酶结合和MAP激酶活性等方面。相关的细胞成分(Cellular Component, CC)有膜筏、转录调节复合物、受体复合物、囊泡腔、细胞质核周区和细胞-细胞连接等。KEGG富集分析结果显示,GXN注射液抗心肌肥厚主要涉及MAPK信号通路、JAK-STAT信号通路、钙信号通路、Wnt信号通路和程序性坏死等通路(图6)。本研究将排名靠前的MAPK信号通路在H9C2细胞上进行验证。

2.6 分子对接

分别将新隐丹参酮、米尔顿酮和脱氧隐丹参酮和PPI网络中度值排名前5位的靶点SRC、STAT3、MAPK1、MAPK3及PIK3R1进行分子

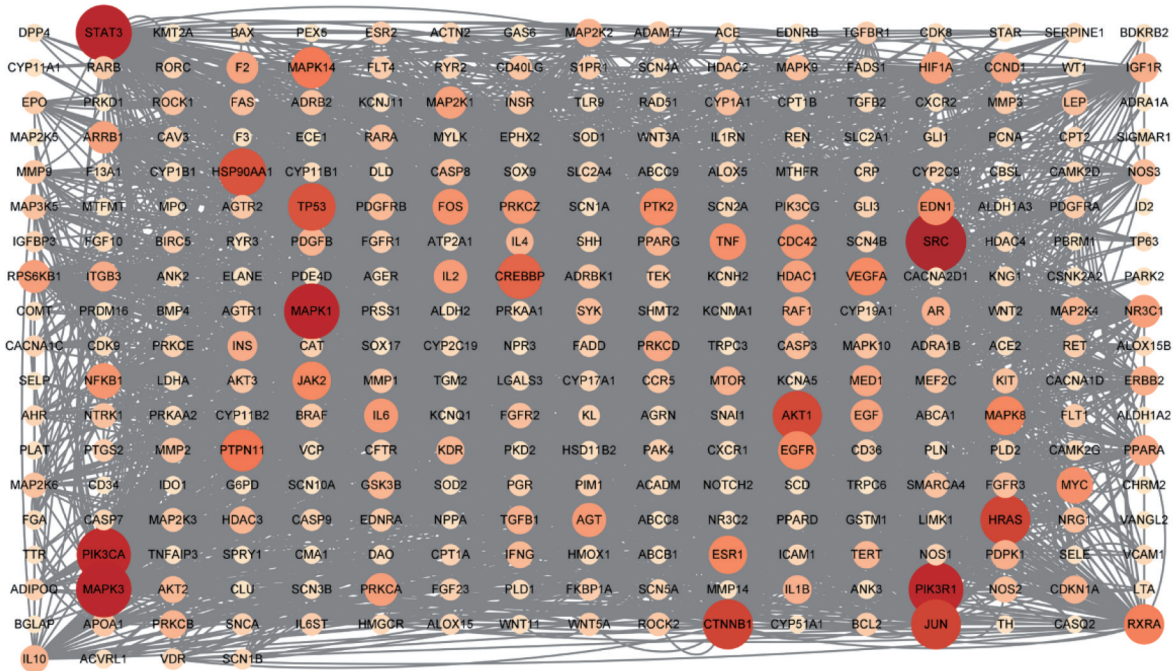


图3 PPI网络图

Fig. 3 PPI network diagram

表1 Network Analysis插件分析PPI网络的拓扑属性
Table 1 Topological properties of the PPI network analyzed by Network Analysis plug-in

Argument	PPI network
Clustering coefficient	0.396
Connected components	1
Network diameter	9
Network radius	5
Network centralization	0.195
Characteristic path length	3.237
Average number of neighbors	11.219
Number of nodes	310
Number of edges	3 478
Network density	0.036
Network heterogeneity	1.161
Isolated nodes	0
Number of self-loops	0
Multi-edge node pairs	0

对接,通过结合能评估活性成分与靶点蛋白的结合活性,结合能越低,说明活性成分与靶点蛋白之间的结合越稳定。一般认为,当结合能小于-7 kcal/mol时说明活性成分与靶点蛋白之间具有很强的结合能力。活性成分与靶点蛋白之间的分子对接结果见表2。对接结果显示,新隐丹参酮与MAPK1(结合能为-7.37 kcal/mol),米尔顿酮与SRC(结合能为-7.62 kcal/mol),脱氧

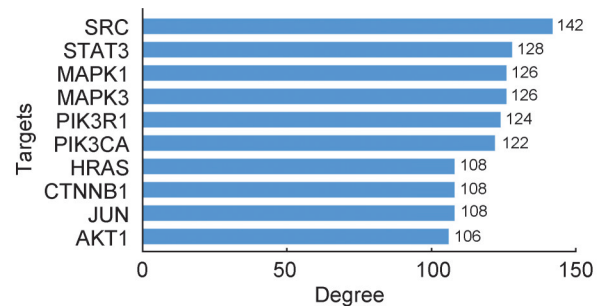


图4 PPI网络中拓扑分析度值排名前10位的靶点

Fig. 4 Ranking of top 10 targets based on topology analysis of the PPI network

隐丹参酮和MAPK3(结合能为-11.44 kcal/mol)的对接较为稳定,利用PyMOL软件将结果进行可视化(图7)。由图7可见,新隐丹参酮与MAPK1的氨基酸残基THR-157,米尔顿酮与SRC的氨基酸残基PHE-150、GLU-146、TYR-149、GLN-144,脱氧隐丹参酮和MAPK3的氨基酸残基ASP-345、THR-341、VAL-344、ARG-165、MET-342、TYR-219均可通过氢键建立连接。

2.7 GXN注射液对心肌细胞活力的影响

为了检测GXN注射液对于肥大的心肌细胞活力的影响,在H9C2细胞中,加入不同浓度的GXN注射液培养24 h,检测细胞存活率(图

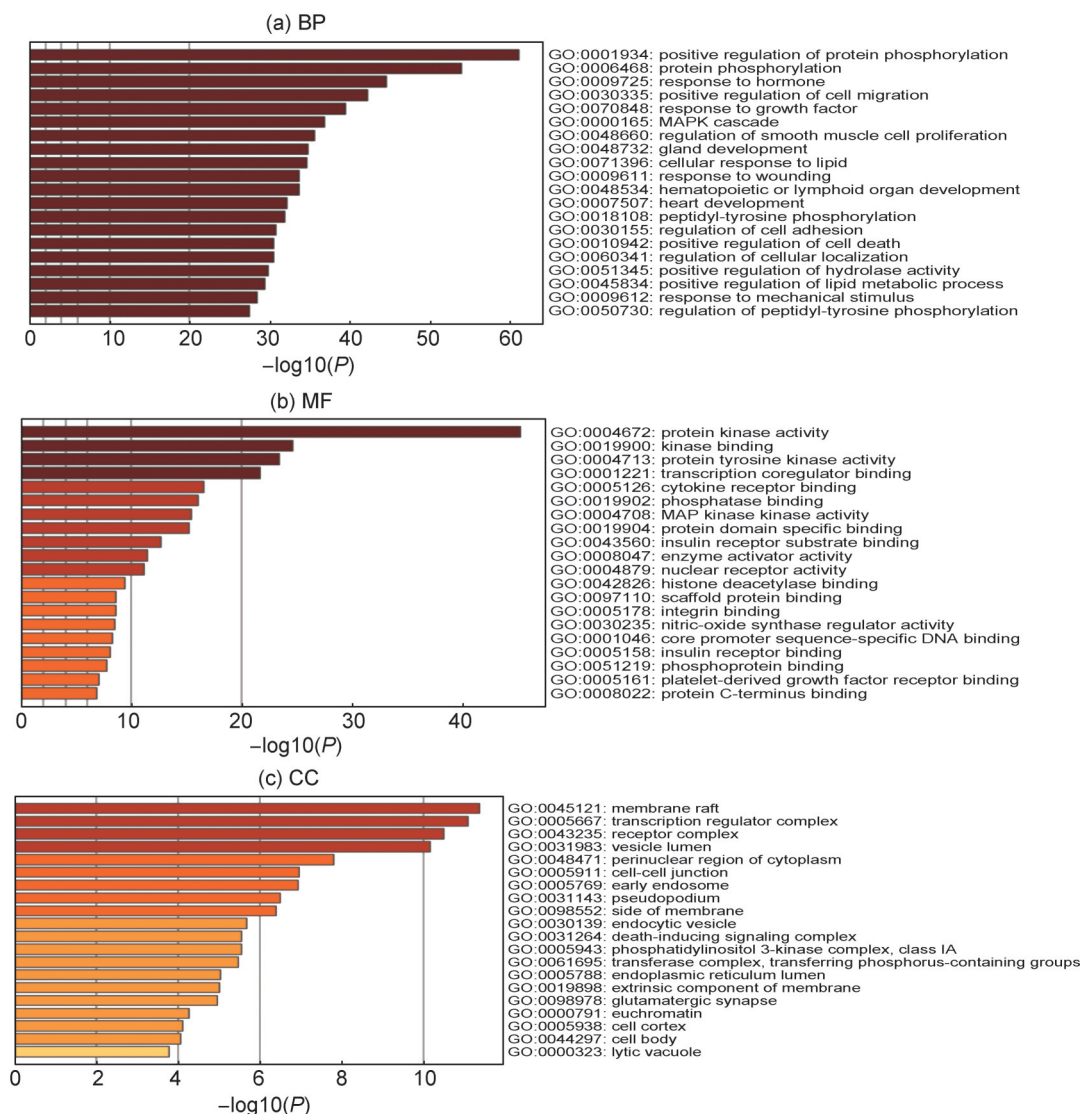


图5 GXN注射液改善心肌肥厚关键靶点的GO功能富集分析

Fig. 5 GO functional enrichment analysis of the key targets of GXN in the improvement of CH

8)。结果显示, GXN注射液在浓度 $5\ \mu\text{L}/\text{mL}$ ~ $20\ \mu\text{L}/\text{mL}$ 范围内并未对心肌细胞表现出明显的细胞毒作用。在此范围内,选择浓度 $5\ \mu\text{L}/\text{mL}$ 、 $10\ \mu\text{L}/\text{mL}$ 和 $20\ \mu\text{L}/\text{mL}$ 分别作为低、中、高剂量进行进一步实验。

2.8 GXN注射液可抑制心肌细胞肥大

为了探索GXN注射液在Ang II刺激的心肌细胞肥大模型中的作用,以 α -SMA染色标记心肌细胞,检测GXN注射液对心肌细胞形态学的影响。结果显示,Ang II处理组心肌细胞面积明显高于对照组,而GXN注射液能够降低Ang II诱导的心肌细胞肥大(图9)。此外,RT-qPCR结果显示,Ang II刺激能够显著增加心肌细胞中肥大标志物ANP和BNP的mRNA水平,而

GXN注射液能够明显抑制肥大相关基因的表达,并且呈现浓度依赖性(图10)。这些结果表明, GXN注射液可抑制Ang II诱导的心肌细胞肥大。

2.9 GXN注射液可通过MAPK信号通路抑制心肌细胞肥大

根据KEGG富集分析结果, MAPK信号通路可能是GXN注射液抗心肌肥厚的关键信号通路之一。为了探索GXN注射液抑制Ang II诱导的心肌细胞肥大的作用机制,利用WB法检测心肌细胞H9C2中MAPK信号通路关键蛋白的表达情况。如图11所示, Ang II刺激能够明显增加p-JNK1/2/t-JNK1/2、p-p38/p38以及p-ERK1/2/t-ERK1/2的比值(注:p为磷酸化形

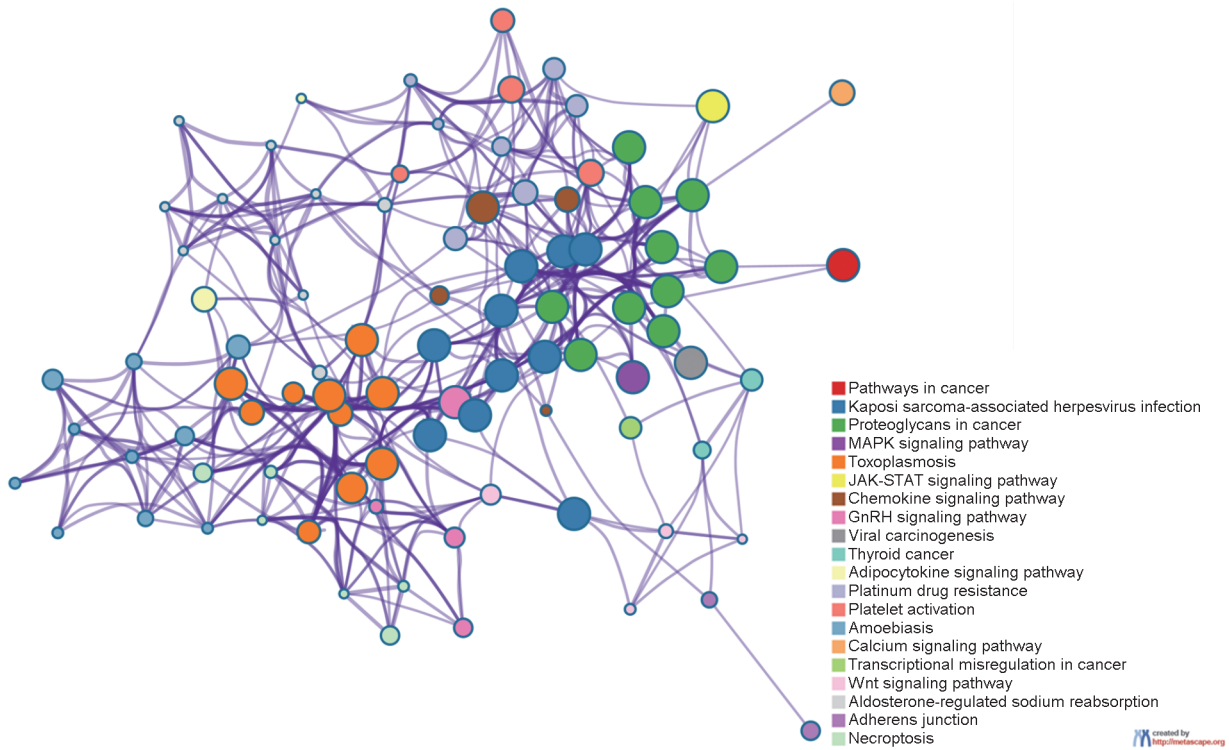


图6 GXN注射液改善心肌肥厚关键靶点的KEGG通路富集分析

Fig. 6 KEGG pathway enrichment analysis of the key targets in the treatment of CH by GXN

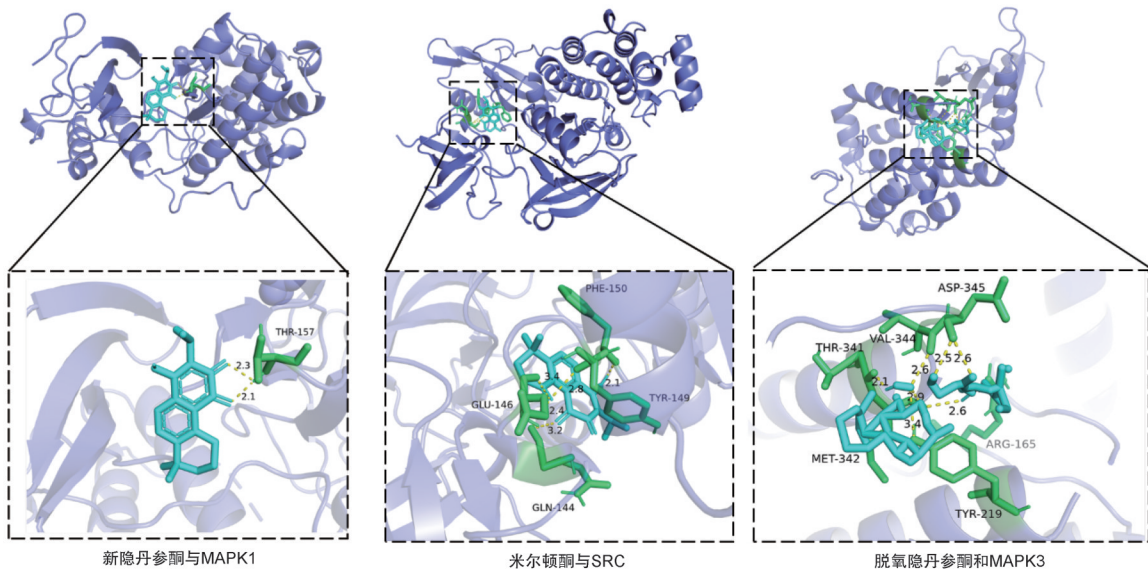


图7 高结合能靶点分子对接可视化结果

Fig. 7 Visualization results of molecular docking of high-binding energy targets

式, t 为总蛋白), 说明 Ang II 增加了 JNK1/2、p38 和 ERK1/2 的磷酸化; 而 GXN 注射液能够明显抑制这些蛋白的磷酸化水平。这些结果均表明, GXN 注射液可以通过 MAPK 信号通路, 抑制 Ang II 诱导的心肌细胞肥大。

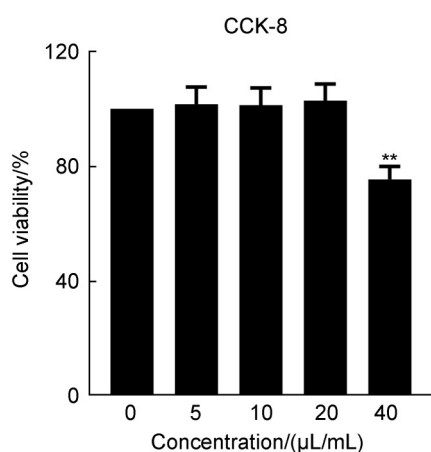
3 分析与讨论

心肌肥厚是心脏持续暴露于压力超负荷或容量超负荷等引起的心脏组织结构异常病变, 心肌发生肥大性重塑, 若不及时干预, 则心脏会发生进行性心功能障碍, 最终导致心力衰竭

表2 活性成分与靶点蛋白之间的分子对接能结果

Table 2 Results of molecular docking binding energy between active components and target proteins

化合物名称	配体名称	PBD数据库编号	亲和度值1	亲和度值2	亲和度值3
新隐丹参酮	SRC	1fmk	-6.41	-6.39	-6.29
	STAT3	6NJS	-6.52	-6.4	-6.37
	MAPK1	4zzn	-7.37	-6.79	-7.19
	MAPK3	3FHR	-6.56	-6.44	-6.52
	PIK3R	1pbw	-6.32	-6.2	-6.05
米尔顿酮	SRC	1fmk	-7.62	-7.46	-7.29
	STAT3	6NJS	-6.64	-6.49	-6.17
	MAPK1	4zzn	-7.39	-7.34	-6.55
	MAPK3	3FHR	-7.31	-7.1	-6.98
	PIK3R	1pbw	-6.34	-6.09	-5.54
脱氧隐丹参酮	SRC	1fmk	-11.02	-10.35	-9.9
	STAT3	6NJS	-8.3	-7.94	-7.92
	MAPK1	4zzn	-10.36	-8.84	-9.77
	MAPK3	3FHR	-11.44	-9.18	-10.69
	PIK3R	1pbw	-7.25	-7.19	-7.06

图8 GXN注射液对心肌细胞活力的影响。** $P < 0.01$ vs Control组Fig. 8 Effect of GXN Injection on cardiomyocytes viability. ** $P < 0.01$ vs. Control group

甚至死亡。病理性心肌肥厚发病机制复杂,目前临床上缺乏有效防治药物。中药因其具有多成分、多途径、多靶点等特点,在防治心肌肥厚中有独特的优势。GXN注射液在临床上常用于治疗冠心病、稳定型或劳累性心绞痛。近年来的研究发现,GXN可降低血浆中BNP的含量,改善心功能^[9]。提示其可能在防治心肌肥厚中发挥重要作用。

本研究基于网络药理学方法,通过挖掘药

物的活性成分以及抗心肌肥厚的关键靶点,构建了GXN注射液抗心肌肥厚“药物-成分-靶点-疾病”网络,为阐明中药药效物质基础和作用机制提供指导。并进一步结合分子对接和体外实验进行验证,全方位、多层次阐明了GXN注射液抗心肌肥厚的作用及其机制。结果显示,GXN注射液共筛选出68个活性成分和382个作用靶点,其中度值排名前三的活性成分为新隐丹参酮II、丹参酚醌和脱氧隐丹参酮,均来自于丹参。其中新隐丹参酮II是与丹参酮结构相似的二萜类化合物,由Lee等首先分离出来^[10]。目前关于其活性的研究较少,Wu等证实了新隐丹参酮在脂多糖刺激的小鼠巨噬细胞(RAW264.7)中的抗炎作用^[11],而Hao等通过分子对接技术证实了新隐丹参酮II的降血糖活性^[12]。目前,尚未有研究报道新隐丹参酮II在心血管疾病中的作用。本研究为后续探索新隐丹参酮在心血管疾病中的作用提供了理论依据。此外,通过PPI核心靶点互作网络分析发现,SRC、STAT3、MAPK1、MAPK3等是作用于上述活性成分的关键靶点。其中,SRC蛋白是非受体酪氨酸激酶,可被多条信号转导途径所激活^[13],而激活后的SRC激酶又通过磷酸化相应靶蛋白的酪氨酸残基使之激活,从而活化下游相应的信号通路,包括MAPK、STAT、PI3K/AKT和EGFR等^[14]。Src激酶可参与AngII等各种原因导致的心脏肥大的信号传导事件^[15],心脏条件性Src敲除可减弱AngII激活的小鼠心脏纤维化和肥大^[16]。综上所述,GXN注射液中的多种有效成分可通过多种靶点改善心肌肥厚。

为了阐明GXN注射液是如何通过这些靶点发挥抗心肌肥厚作用,本研究对核心靶点进行了KEGG通路分析。结果显示,GXN注射液改善心肌肥厚主要涉及MAPK信号通路、JAK-STAT信号通路、钙信号通路等。MAPK是丝氨酸-苏氨酸蛋白激酶家族的一员,在细胞增殖、分化、迁移、凋亡等过程中起着重要的作用^[17]。在心脏组织中,MAPK信号通路是非常重要的细胞内信号传导途径,对心肌肥大的发生与发展发挥着重要作用^[18]。在肥大的心脏组织和心肌细胞中,MAPK信号通路被激

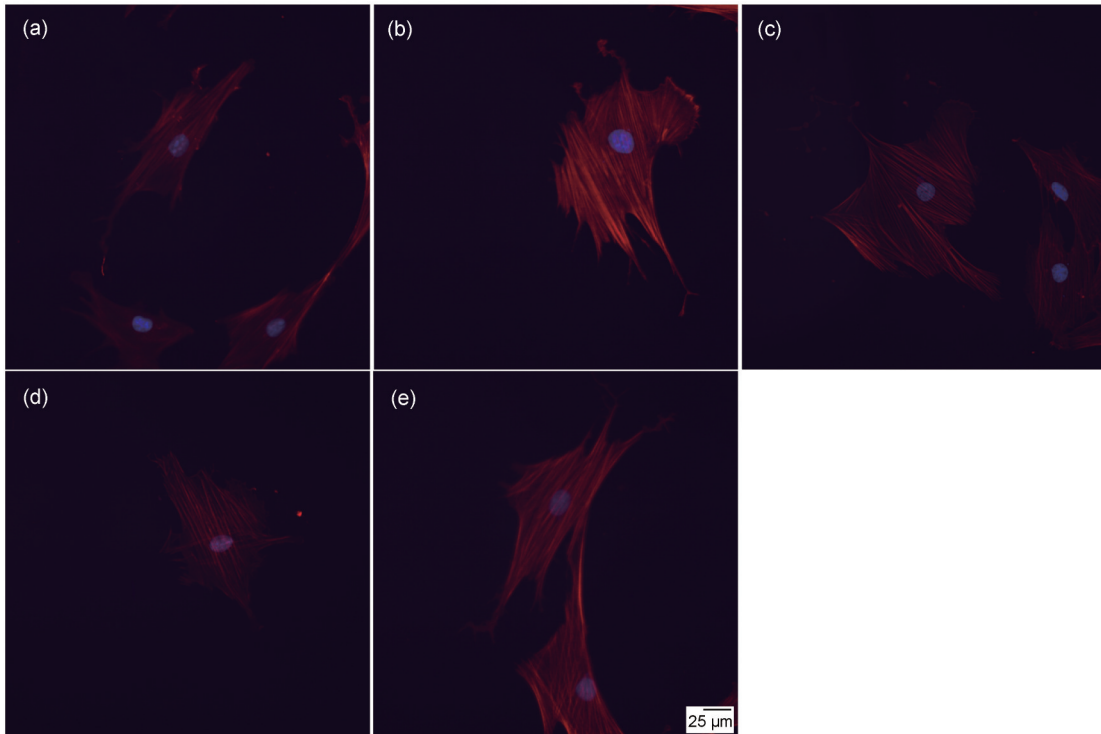
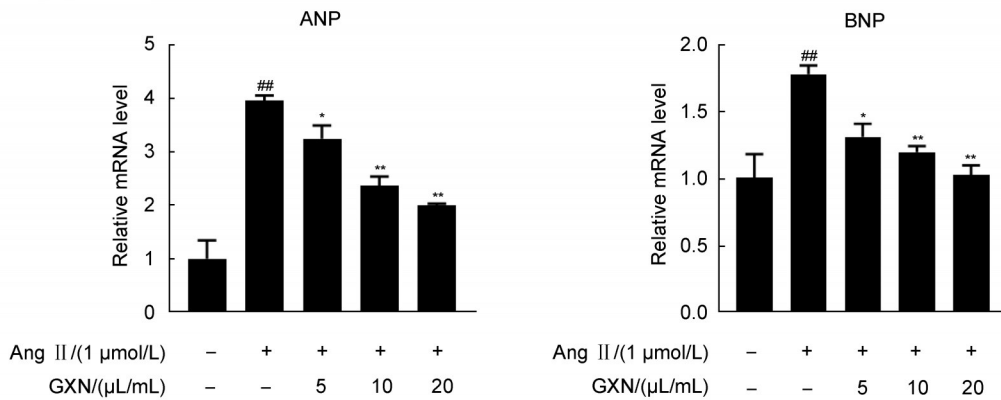


图9 GXN注射液对于心肌细胞面积的影响

(a) 对照组(control group); (b) 模型组(Ang II组); (c) 低剂量组(Ang II + 5 μL/mL GXN组); (d) 中剂量组(Ang II + 10 μL/mL GXN组); (e) 高剂量组(Ang II + 20 μL/mL GXN组)

Fig. 9 Effect of GXN Injection on the area of cardiomyocytes

(a) Control group; (b) model group (Ang II group); (c) low dose group (Ang II+5 μL/mL GXN group); (d) medium dose group (Ang II+10 μL/mL GXN group); (e) high dose group (Ang II+20 μL/mL GXN group)



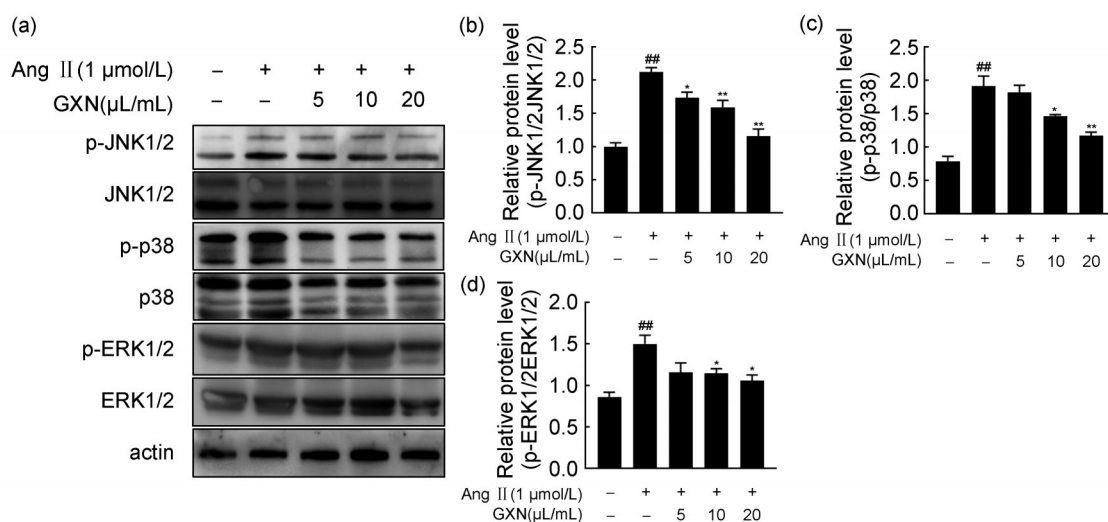
注: ^{##} $P < 0.01$ vs 对照组; ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$ vs Ang II组。+代表本组添加Ang II, -代表本组不添加Ang II和GXN。

图10 GXN注射液对于心肌细胞ANP(a)、BNP mRNA(b)水平的影响

Fig. 10 Effect of GXN Injection on the levels of ANP (a) and BNP mRNA (b) in H9C2 cardiomyocytes

活^[19]。抑制MAPK信号通路可减轻压力超负荷诱导的病理性心肌肥厚和PE诱导的心肌细胞肥大^[20]。在介导心肌肥厚的各种信号通路中,JAK-STAT信号通路在响应压力超负荷以及各种细胞因子等刺激中发挥着重要作用^[21]。STAT可通过其转录作用参与心肌肥大,小鼠心肌组织STAT的过表达可引起心肌肥厚。相

反,抑制STAT可抑制胶原合成,改善心肌肥大。STAT是心肌肥厚的潜在治疗靶点^[22]。钙信号通路是GXN注射液改善心肌肥厚的又一关键通路,作为细胞内最重要的第二信使,Ca²⁺在心肌细胞的多种功能中均发挥重要作用。在正常生理状态下,Ca²⁺可通过参与心脏兴奋-收缩耦合过程调控心肌细胞收缩。而在



注: ^{##} $P < 0.01$ vs 对照组; ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$ vs Ang II组。+代表本组添加 Ang II, -代表本组不添加 Ang II 和 GXN。

Note: ^{##} $P < 0.01$ vs. control group; ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$ vs. Ang II group and GXN.

图 11 GXN 注射液对于心肌细胞 MAPK 信号通路关键蛋白的影响

(a) 各组心肌细胞中 MAPK 信号传导关键蛋白磷酸化水平和总蛋白表达水平; (b) 心肌细胞中 MAPK 信号通路关键蛋白 p-JNK1/2/JNK1/2; (c) p-p38/p38; (d) p-ERK1/2/ERK1/2 表达情况统计图。

Fig. 11 Effect of GXN Injection on MAPK signaling pathway in cardiomyocytes

(a) The phosphorylation and expression levels of certain representative proteins involved in the MAPK signaling pathway;

(b) Quantification of p-JNK1/2/t-JNK1/2; (c) p-p38/p38; (d) p-ERK1/2/t-ERK1/2 in cardiomyocytes.

病理状态下,钙信号通路的异常可促进心肌肥厚的发生。在心肌肥厚的状态下,心肌细胞内 Ca^{2+} 浓度升高,心肌细胞发生钙超载,同时心肌细胞中钙调控相关基因的表达水平和活性异常,则进一步加重心肌肥厚反应。

为了验证 GXN 注射液改善心肌肥厚的作用机制,本研究在体外利用 Ang II 构建心肌细胞肥大模型,表现为心肌细胞面积和心肌细胞肥大相关分子标志物的表达明显上升。而 GXN 注射液处理后,心肌细胞面积减小,心肌细胞肥大相关分子标志物的表达显著下降,说明 GXN 可抑制 Ang II 诱导的心肌细胞肥大。WB 实验对 KEGG 通路分析的结果进行了验证,研究发现, GXN 注射液可通过 MAPK 信号通路抑制心肌肥厚。

综上所述,本研究通过网络药理学、分子对接以及体外实验验证等方法,探索了 GXN 注射液改善心肌肥厚的作用及其机制,证明 GXN 注射液抗心肌肥厚具有多成分、多靶点和多途径的特点,并在体外构建心肌肥厚模型中证实 GXN 注射液可通过 MAPK 信号通路改善心肌肥厚,为 GXN 注射液的深入开发提供了依据。

参考文献:

- [1] 《中国心血管健康与疾病报告》编写组.《中国心血管健康与疾病报告 2022》要点解读[J]. 中国心血管杂志, 2023, **28**(4): 297-312. DOI: 10.3969/j.issn.1007-5410.2023.04.001. The Writing Committee of the Report on Cardiovascular Health and Diseases in China. Interpretation of Report on Cardiovascular Health and Diseases in China 2022[J]. *Chin J Cardiovasc Med*, 2023, **28**(4): 297-312. DOI: 10.3969/j.issn.1007-5410.2023.04.001.
- [2] MARTIN T G, JUARROS M A, LEINWAND L A. Regression of Cardiac Hypertrophy in Health and Disease: Mechanisms and Therapeutic Potential[J]. *Nat Rev Cardiol*, 2023, **20**(5): 347-363. DOI: 10.1038/s41569-022-00806-6.
- [3] DENG Y, LIU W, YANG X C, *et al.* Intensive Blood Pressure Lowering Improves Left Ventricular Hypertrophy in Older Patients with Hypertension: The STEP Trial [J]. *Hypertension*, 2023, **80**(9): 1834-1842. DOI: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.122.20732.
- [4] 呼明哲,李湘玲,金静怡,等.丹参饮预处理对心肌缺血再灌注大鼠血流动力学和线粒体能量代谢的影响[J]. 中成药, 2022, **44**(7): 2119-2125. DOI: 10.3969/j.issn.1001-1528.2022.07.009. HU M Z, LI X L, JIN J Y, *et al.* Effects of Danshen Decoction Pretreatment on Cardiac Hemodynamics and Mitochondrial Energy Metabolism in Rats with Myocardial Ischemia Reperfusion Injury[J]. *Chin Tradit Pat Med*,

- 2022, **44**(7): 2119–2125. DOI: 10.3969/j.issn.1001-1528.2022.07.009.
- [5] HO T J, WU H C, BHARATH KUMAR V, *et al.* Danshen (*Salvia miltiorhiza*) Inhibits Leu27 IGF-II-induced Hypertrophy in H9c2 Cells[J]. *Environ Toxicol*, 2020, **35**(10): 1043–1049. DOI: 10.1002/tox.22940.
- [6] LI D, LONG Y, YU S, *et al.* Research Advances in Cardio-cerebrovascular Diseases of *Ligusticum chuansiong* Hort[J]. *Front Pharmacol*, 2022, **12**: 832673. DOI: 10.3389/fphar.2021.832673.
- [7] 贾彩霞, 陈建新, 高阔, 等. 川芎治疗心力衰竭的网络药理学研究[J]. *世界中医药*, 2020, **15**(8): 1093–1097. DOI: 10.3969/j.issn.1673-7202.2020.08.001.
JIA C X, CHEN J X, GAO K, *et al.* Network Pharmacology Study of Sichuan Lovage Rhizome on Heart Failure [J]. *World Chin Med*, 2020, **15**(8): 1093–1097. DOI: 10.3969/j.issn.1673-7202.2020.08.001.
- [8] 赵新望, 徐文华, 赵阳, 等. 基于网络药理学研究川芎治疗冠心病的作用机制[J]. *中成药*, 2019, **41**(9): 2096–2101. DOI: 10.3969/j.issn.1001-1528.2019.09.015.
ZHAO X W, XU W H, ZHAO Y, *et al.* Action Mechanisms of Chuanxiong Rhizoma in Treating Coronary Heart Disease Based on Network Pharmacology[J]. *Chin Tradit Pat Med*, 2019, **41**(9): 2096–2101. DOI: 10.3969/j.issn.1001-1528.2019.09.015.
- [9] 余柳莹, 迟永生, 况珊. 冠心宁片联合口服营养补充剂治疗冠心病慢性心力衰竭的临床疗效[J]. *中国现代医生*, 2022, **60**(20): 67–69.
YU L Y, CHI Y S, KUANG S. The Clinical Curative Effect of Guanxinling Tablet Combined Oral Nutritional Supplements in Treatment of Coronary Heart Disease of Chronic Heart Failure[J]. *China Mod Dr*, 2022, **60**(20): 67–69.
- [10] LEE A R, WU W L, CHANG W L, *et al.* Isolation and Bioactivity of New Tanshinones[J]. *J Nat Prod*, 1987, **50**(2): 157–160. DOI: 10.1021/np50050a004.
- [11] WU C H, ZHAO W W, ZHANG X N, *et al.* Neocryptotanshinone Inhibits Lipopolysaccharide-induced Inflammation in RAW_{264.7} Macrophages by Suppression of NF-KB and iNOS Signaling Pathways[J]. *Acta Pharm Sin B*, 2015, **5**(4): 323–329. DOI: 10.1016/j.apsb.2015.01.010.
- [12] HAO J, QIAN Z M, LIU Z J, *et al.* The Antidiabetic Activities of Neocryptotanshinone: Screened by Molecular Docking and Related to the Modulation of PTP1B[J]. *Nutrients*, 2022, **14**(15): 3031. DOI: 10.3390/nu14153031.
- [13] WANG W J, LI W Q, LIU K, *et al.* Src Mediates B-adrenergic Receptor Induced YAP Tyrosine Phosphorylation[J]. *Sci China Life Sci*, 2020, **63**(5): 697–705. DOI: 10.1007/s11427-020-1652-9.
- [14] 刘萌芽, 史礼君, 李金鑫, 等. 萝卜硫素通过Src/PI3K/Akt通路调控人脐静脉内皮细胞NO的生成机制[J]. *中国医院药学杂志*, 2021, **41**(24): 2526–2529. DOI: 10.13286/j.1001-5213.2021.24.04.
LIU M Y, SHI L J, LI J X, *et al.* Sulforaphane Regulated Nitric Oxide Production via Src/PI3K/Akt Pathway in Human Umbilical Vein Endothelial Cells[J]. *Chin J Hosp Pharm*, 2021, **41**(24): 2526–2529. DOI: 10.13286/j.1001-5213.2021.24.04.
- [15] CHIEN P T Y, LIN C C, HSIAO L D, *et al.* C-SRC/Pyk2/EGFR/PI3K/Akt/CREB-activated Pathway Contributes to Human Cardiomyocyte Hypertrophy: Role of COX-2 Induction[J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2015, **409**: 59–72. DOI: 10.1016/j.mce.2015.04.005.
- [16] ZHONG X, SONG Z G, NING Z P, *et al.* Inhibition of Src Improves Cardiac Fibrosis in AngII-induced Hypertrophy by Regulating the Expression of Galectin-3[J]. *Microvasc Res*, 2022, **142**: 104347. DOI: 10.1016/j.mvr.2022.104347.
- [17] HEPWORTH E M W, HINTON S D. Pseudophosphatases as Regulators of MAPK Signaling[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, **22**(22): 12595. DOI: 10.3390/ijms222212595.
- [18] TAKANO A P C, SENGER N, BARRETO-CHAVES M L M. The Endocrinological Component and Signaling Pathways Associated to Cardiac Hypertrophy[J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2020, **518**: 110972. DOI: 10.1016/j.mce.2020.110972.
- [19] KUMAR S, WANG G, ZHENG N, *et al.* HIMF (Hypoxia-induced Mitogenic Factor)-IL (Interleukin)-6 Signaling Mediates Cardiomyocyte-fibroblast Crosstalk to Promote Cardiac Hypertrophy and Fibrosis[J]. *Hypertension*, 2019, **73**(5): 1058–1070. DOI: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.118.12267.
- [20] LIAO H H, ZHANG N, MENG Y Y, *et al.* Myricetin Alleviates Pathological Cardiac Hypertrophy via TRAF6/TAK1/MAPK and Nrf2 Signaling Pathway[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2019, **2019**: 6304058. DOI: 10.1155/2019/6304058.
- [21] LI Y, ZHOU W W, SUN J H, *et al.* Modified Citrus Pectin Prevents Isoproterenol-induced Cardiac Hypertrophy Associated with P38 Signalling and TLR4/JAK/STAT3 Pathway[J]. *Biomed Pharmacother*, 2021, **143**: 112178. DOI: 10.1016/j.biopha.2021.112178.
- [22] HARHOUS Z, BOOZ G W, OVIIZE M, *et al.* An Update on the Multifaceted Roles of STAT3 in the Heart [J]. *Front Cardiovasc Med*, 2019, **6**: 150. DOI: 10.3389/fcvm.2019.00150.