

基于体外药效学结合分子对接技术研究穿山龙抗心肌缺血的作用机制

杨小芳¹, 孔韧², 权建野¹, 袁博³, 闫寒^{1*}, 卜伟^{3,4*}

1. 中国中医科学院 医学实验中心, 北京 100700
2. 江苏理工学院 生物信息与医药工程研究所, 江苏 常州 213001
3. 江苏师范大学 生命科学院, 江苏 徐州 221116
4. 江苏师范大学 科学技术研究院, 江苏 徐州 221116

摘要: **目的** 通过液质联用技术、体外药效学及分子对接技术探究穿山龙抗心肌缺血的物质基础和作用机制。**方法** 利用 UPLC-Q TOF-MS 技术确定穿山龙醇提取物中的主要成分, 比较不同质量浓度 (40、10、4、0.4、0.004 mg/mL) 的穿山龙醇提取物对 H9c2 心肌细胞缺氧/复氧 (H/R) 损伤后细胞活力的影响。应用 AutoDock 软件对潜在药效物质和关键靶点进行分子对接, 相关结果采用 Cytoscape 3.6.1 进行构图和网络拓扑结构分析。**结果** 从穿山龙的醇提取物中鉴定出 7 个化学成分, 并证明穿山龙醇提取物对 H/R 损伤 H9c2 心肌细胞具有一定的保护作用。筛选出 5 种 (薯蓣皂苷元、薯蓣皂苷、对羟基苯基酒石酸、原薯蓣皂苷、薯蓣次皂苷 A) 与抗心肌缺血相关的活性成分, 5 种活性成分分子对接结果显示潜在的药效物质与关键靶点内皮一氧化氮合酶 (NOS) 2、NOS3、环氧化酶/细胞色素 C 氧化酶多肽 II (COX2)、热休克蛋白 (HSP70) 对接结果能量低于 -8 kcal/mol。**结论** 穿山龙中的甾体皂苷类成分可能是其治疗心肌缺血的物质基础, 穿山龙治疗心肌缺血是多成分与多靶点相互作用的结果。

关键词: 穿山龙; 抗心肌缺血; UPLC-Q TOF-MS 技术; 薯蓣皂苷元; 薯蓣皂苷; 对羟基苯基酒石酸; 原薯蓣皂苷; 薯蓣次皂苷 A

中图分类号: R285 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2023)04-0767-09

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2023.04.004

Mechanism of *Dioscoreae Nipponicae Rhizoma* treating myocardial ischemia based on pharmacodynamics *in vitro* combined with molecular docking

YANG Xiao-fang¹, KONG Ren², QUAN Jian-ye¹, YUAN Bo³, YAN Han¹, BU Wei^{3,4}

1. Experimental Research Center, China Academy of Chinese Medicine Sciences, Beijing 100700, China
2. Institute of Bioinformatics and Medical Engineering, Jiangsu University of Technology, Changzhou 213001, China
3. School of Life Sciences, Jiangsu Normal University, Xuzhou 221116, China
4. Institute of Science and Technology, Jiangsu Normal University, Xuzhou 221116, China

Abstract: Objective To study the material basis and mechanism of anti-myocardial ischemia of *Dioscoreae Nipponicae Rhizoma* through LC-MS technology, pharmacodynamics *in vitro*, and molecular docking technology. **Methods** The UPLC-Q TOF-MS technology was used to identify the main compounds of *Dioscoreae Nipponicae Rhizoma*. The effects of methanol extracts of *Dioscoreae Nipponicae Rhizoma* with different concentrations (40, 10, 4, 0.4, and 0.004 mg/mL) on the viability of H9c2 myocardial cells after hypoxia/reoxygenation injury were observed. Autodock vina software was used to perform molecular docking between potential pharmacodynamic substances and key targets. The related results were mapped and analyzed by Cytoscape 3.6.1. **Results** Seven chemical components were identified from the methanol extract of *Dioscoreae Nipponicae Rhizoma*, and the methanol extract of *Dioscoreae Nipponicae Rhizoma* was proved to have a protective effect on H9c2 myocardial cells injury by hypoxia/reoxygenation. Furthermore, the components of DNR were screened and five active components (diosgenin, dioscin, piscidic acid, protodioscin, and

收稿日期: 2022-12-27

基金项目: 国家自然科学基金青年基金项目 (61603160); 江苏省自然科学基金项目 (BK20201464); 江苏省高校自然科学研究面上项目 (20KJB520011); 徐州市重点研发计划项目 (KC22113)

作者简介: 杨小芳, 在读博士研究生, 主要从事中药成分分析研究。E-mail: 2416584246@qq.com

*通信作者: 闫寒, 主管技师, 从事中药质量控制研究。E-mail: yanhanarrow@163.com

卜伟, 从事中药指纹图谱、谱效关联度及药效物质基础研究, 生物信息学研究。E-mail: buweijssf@163.com

prosopogenin A) related to anti-myocardial ischemia were identified. The results of molecular docking showed that the energy of potential pharmacodynamic substances with key targets NSO2, NSO3, COX2, and HSP70 was lower than -8 kcal/mol. **Conclusion** The compounds of *Dioscoreae Nipponicae Rhizoma* such as steroid saponins might be the material basis for the treatment of myocardial ischemia. *Dioscoreae Nipponicae Rhizoma* treatment of myocardial ischemia is the result of the interaction between multi-component and multi-target.

Key words: *Dioscoreae Nipponicae Rhizoma*; anti-myocardial ischemia; UPLC-Q TOF-MS method; diosgenin; dioscin; piscidic acid; protodioscin; prosopogenin A

心肌缺血是指心脏的血液灌注减少,不能支持心脏正常工作的病理状态,常引起心肌梗死、心绞痛、缺血性心脏病等^[1-2]。《中国心血管健康与疾病报告 2021 概要》显示^[3],中国心血管病患率逐年增加,且现患者达 3.30 亿。随着西医的不断发展,以他汀类药物治疗和外科介入手术治疗减少了心肌缺血引起的心脑血管疾病的病死率。但他汀类药物存在引起肝肾损伤的风险,并且他汀类药物治疗后心血管疾病残留的风险仍然存在。外科介入手术能够暂时的缓解冠状动脉狭窄的情况,但容易复发,不能从根本上解决疾病状况。中药含有多种成分,治疗疾病多是综合协调多成分、多靶点等,在心肌缺血的治疗中受到广泛关注。

穿山龙为薯蓣科薯蓣属植物穿龙薯蓣 *Dioscorea nipponica* Makino 的干燥根茎,具有祛风除湿、舒筋通络、活血止痛、止咳平喘的功效^[4]。研究表明,穿山龙药材中甾体皂苷类成分是其主要的活性成分^[5-6]。现代药理学研究发现,穿山龙药材中所含甾体皂苷类成分具有抗心肌缺血、调节血脂、抗动脉粥样硬化、抑制血小板聚集、抗炎、抗氧化应激等作用^[7-12]。药效学研究发现,穿山龙可以通过升高线粒体膜电位,减少受损心肌乳酸脱氢酶(LDH)的释放,提高超氧化物歧化酶(SOD)活性,减少丙二醛(MDA)水平提高心肌细胞存活率,但缺乏对其机制的研究^[7, 13]。

超高效液相色谱-四极杆飞行时间质谱仪(UPLC-Q TOF-MS)是一项高分辨率和高通量技术,与传统化学成分分离鉴别方法相比,具有简单、快速和准确的特点,能够对中药小分子化合物进行表征,是分析中药复杂成分的有效工具。分子对接方法是通过化学计量学方法模拟分子的几何结构和分子间作用力来进行分子间相互作用识别并预测受体-配体复合物结构的方法,是一种重要的计算机辅助药物分子设计手段,对中药药效物质基础的高效、快速筛选,以及药效作用机制研究有重要意义^[14-15]。本研究主要利用 UPLC-Q TOF-MS 技术对

穿山龙醇提物中主要成分进行鉴定,以及体外细胞实验确定穿山龙醇提物具有抗心肌缺血的作用,然后结合分子对接方法,探究穿山龙作用于心肌缺血的活性分子的作用机制,并构建多成分-靶点蛋白网络模型,筛选穿山龙抗心肌缺血物质基础,为进一步探讨穿山龙对心肌缺血疾病的治疗提供参考。

1 材料

1.1 仪器

3111 二氧化碳细胞培养箱(美国 Thermo Scientific 公司); SW-CJ-2FD 超净工作台(苏州安泰空气技术有限公司); CKX41 显微镜(日本 Olympus 公司); OLB-H-C 振荡器(济南欧莱博技术有限公司); BCD-530WED 低温冰箱(合肥晶弘电器有限公司); Multiskan GO 全波长酶标仪(美国 Thermo Scientific 公司); KCD-40 离心机(科大创新股份有限公司); ACQUITY UPLC I-CLASS System 型液相色谱仪(美国 Waters 公司); Xevo G2-XS QTOF 型高分辨串联质谱(美国 Waters 公司); Quintix65-1CN 分析天平($d=0.01\text{mg}$)(德国 Sartorius 公司); KQ-500DE 数控超声波清洗器(宁波江南仪器厂); VIBRAX VXR basic 涡旋混合器(德国 IKA 公司); Mikro 220R 小型台式(冷冻)离心机(德国 Hettich 公司)。

1.2 药物与试剂

薯蓣皂苷元(质量分数 98%,批号 AF0022327)、薯蓣皂苷(质量分数 98%,批号 AF8070683)、原薯蓣皂苷(质量分数 98%,批号 AF20050151)、薯蓣次皂苷 A(质量分数 98%,批号 AF20050105)对照品购自成都埃法生物科技有限公司。胎牛血清(批号 10099-141)、DMEM 高糖培养基(批号 8117283)、DMEM 无糖培养基(批号 1897256)、青链霉素双抗(批号 15070063)、胰蛋白酶(批号 25200072)、PBS 缓冲液(批号 20012027)等试剂购自于美国 Gibco 公司; CCK-8 试剂盒(南京碧云天生物科技研究); 乙腈、甲醇和甲酸(LC-MS 级,美国 Fisher 公司),实验用水为自制超纯水(美国 Millipore 公

司)。H9c2 心肌细胞 (江苏凯基生物技术股份有限公司)。穿山龙购自于安徽省亳州市, 经江苏师范大学袁博副教授鉴定为穿龙薯蓣 *Dioscorea nipponica* Makino 的干燥根茎。

2 方法

2.1 穿山龙化学成分分析

2.1.1 供试品溶液的制备 称取穿山龙药材粉末 25 mg, 置于 2 mL 离心管内, 加入 1 mL 甲醇, 涡旋 1 min, 常温下超声提取 30 min (500 W, 40 kHz), 离心 10 min, 吸取上清液, 按照上述步骤再重复提取 2 次, 合并 3 次滤液。将合并后的滤液稀释 10 倍, 涡旋 1 min, 14 000 r/min 条件下离心 10 min, 取上清液备用。

2.1.2 色谱条件 ACQUITY UPLC BEH C₁₈ 色谱柱 (100 mm×2.1 mm, 1.7 μm); 流动相: 0.1% 甲酸溶液 (A) 和 0.1% 乙腈 (B), 梯度洗脱: 0~7 min, 19%~80% B; 7~9.5 min, 80%~100% B; 9.5~10.5 min, 100% B; 10.5~12.0 min, 100%~19% B; 体积流量: 0.3 mL/min; 柱温: 40 °C; 进样量: 1 μL。

2.1.3 质谱条件 ESI 离子源, 采用正、负离子模式扫描。ESI 源参数保持如下: 正离子模式下, 毛细管电压 3.0 KV, 锥体电压 40 V, 离子源温度 100 °C, 去溶剂化温度 250 °C。锥孔气流量为 50 L/h, 去溶剂气流量: 600 L/h。负离子模式下, 毛细管电压 2.5 KV, 锥体电压 40 V, 离子源温度 100 °C, 去溶剂化温度 450 °C。锥孔气流量为 50 L/h, 去溶剂气流量: 800 L/h。在 MSE 连续模式下, MS 扫描的采集范围为 m/z 50~1 200。采用甲酸钠溶液对仪器进行校正, 亮氨酸-脑啡肽 [M+H]⁺ 556.277 1 和 [M-H]⁻ 554.261 5 作为 LockSpray™ 校正标准液 (200 pg/mL), 实时校正的体积流量为 5 μL/min。

2.1.4 数据处理 质谱数据采集及处理软件 MassLynx V4.1 工作站。

2.2 穿山龙抗心肌缺血药效实验

2.2.1 细胞培养 H9c2 细胞培养于含有 10% 胎牛血清的 DMEM 高糖培养基中 (其中添加青霉素 100 U/mL、链霉素 100 U/mL), 在 37 °C, 5% CO₂ 正常培养箱培养, 每 24 小时更换 1 次培养基。待细胞生长融合到 80% 以上时, 使用 0.25% 胰酶消化后代培养。取对数生长期的细胞进行试验。

2.2.2 CCK-8 确定 H9c2 细胞缺氧时间 取对数生长期的 H9c2 心肌细胞, 以 1×10⁵/μL 接种于 96 孔板, 待细胞长至 80% 以上, 放入 94% N₂、1% O₂、

5% CO₂ 的三气培养箱中分别缺氧 6、8、12、16、24 h 后取出, 换成无血清 DEME 高糖培养基放入 5% CO₂ 正常培养箱中复氧 2 h, 吸弃培养液, 加入 CCK-8 测试细胞活力作为模型组, 对照组的细胞全程使用 DEME 高糖培养基进行常规培养。

2.2.3 CCK-8 观察不同浓度穿山龙提取物对缺氧/复氧 (H/R) H9c2 细胞活力的影响 通过前期实验的基础研究^[6], 制备穿山龙醇提物可按照以下步骤进行: 分别取适量穿山龙药材原料高速粉碎成 50~100 目颗粒, 准确称取 1 g 药材原料, 加入 30 mL 左右的甲醇浸泡 10 min, 超声提取 30 min, 滤过, 药渣重复 3 次, 合并提取液减压浓缩至干。精密称取干燥的穿山龙醇提物 40.0 mg, 溶于 DMEM 高糖培养基中, 配制成 40 mg/mL 的储存液, 0.45 μm 滤膜滤过, 以 DMEM 高糖培养基稀释成相应的最终质量浓度 (40、10、4、0.4、0.004 mg/mL), 置于 4 °C 冰箱备用。取对数生长期的心肌细胞, 以 1×10⁶/μL 接种于孔板, 分为对照组、模型组和穿山龙提取物 40、10、4、0.4、0.004 mg/mL 组。对照组给予正常培养不予药物处理, 模型组细胞进行缺氧 8 h 及复氧 2 h, 不同质量浓度穿山龙给药组预处理 24 h 后, 再进行缺氧/复氧处理, 吸弃培养液, 每孔加入 CCK-8 溶液 10 μL, 37 °C 培养箱孵育 48 h 后, 在酶标仪 450 nm 处检测吸光度 (A) 值, 计算细胞的存活率。每组设置 5 个复孔, 实验重复 3 次取平均值。

2.3 分子对接技术分析

2.3.1 目标化合物的收集与处理 选取好的化合物采用 OpenBabel 2.3.2 生成其三维结构, 加氢并保存为 mol2 文件格式备用。

2.3.2 心肌缺血相关靶点蛋白的选择 通过数据库 DrugBank、Therapeutic Target Database 以及相关文献数据^[7]收集靶点蛋白, 将查询到的靶点蛋白输入 UniProt 数据库获得靶点蛋白的官方命名, 再通过 PDB 数据库选择结合了小分子化合物的复合物晶体结构的靶蛋白, 并下载三维结构保存备用。

2.3.3 分子对接 利用 AutoDock Tools 软件, 对筛选出的靶蛋白去水、加氢、添加原子电荷、设置原子类型, 存为 pdbqt 格式, 作为受体备用。运用 AutoDock Vina 将化合物与受体蛋白分别进行分子对接, 并对对接结果进行分析。

2.3.4 小分子化合物与靶蛋白作用网络的构建 用 Cytoscape 3.6.1 软件构建多成分和靶点网络模型。

3 结果

3.1 穿山龙中化学成分分析

本研究采用 UPLC-Q TOF-MS 技术采集的原始质谱数据可通过 MassLynx V 4.1 进行分析并得到穿山龙样品的基峰离子色谱 (BPI) 图 (图 1)。

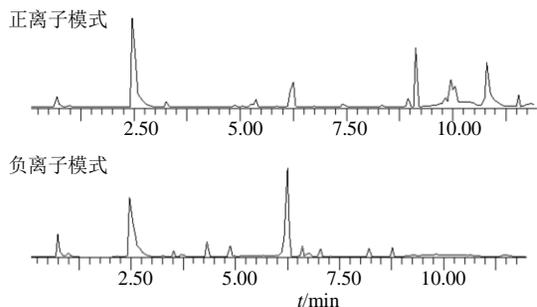


图 1 穿山龙样品的 BPI 图

Fig. 1 BPI diagram of *Dioscoreae Nipponicae Rhizoma* sample

依据文献资料^[18]、Scifinder 和 Web of Science 数据库对穿山龙植物中的化合物进行检索, 寻找它们的二级碎裂规律, 并依据质量偏差小于 5×10^{-6} 的原则, 确定各色谱峰对应的化合物。根据上述方法共鉴定和推测出 7 种化学成分, 主要为甾体皂苷类成分, 见表 1。

3.2 不同缺氧时间对 H9c2 心肌细胞的影响

用 CCK-8 测定不同缺氧时间的细胞存活率, 结果见表 2。总体来说, 随着缺氧时间的增加, 细胞存活率呈下降趋势, 缺氧 6 h 后, 细胞存活率仍高达 70.32%, 但是缺氧 12 h 后, 细胞存活率显著下降 ($P < 0.05$), 细胞缺氧时间长会导致细胞坏死性死亡, 因此选择缺氧 8 h 为最佳缺氧时间。

3.3 不同给药浓度对 H/R H9c2 心肌细胞的作用

经 SPSS 24.0 统计检验, 从图 2 可以看出模型

表 1 穿山龙的化学成分鉴定结果

Table 1 Chemical composition identification results of *Dioscoreae Nipponicae Rhizoma*

序号	模式	t_R /min	化合物	分子式	理论值 (m/z)	测量值 (m/z)	误差 ($\times 10^{-6}$)	碎片离子 (m/z)
1	ESI ⁻	0.74	D-(-)-奎宁酸	C ₇ H ₁₂ O ₆	191.055 6	191.055 6	0.0	173.04、161.04、145.06
2	ESI ⁻	0.79	对羟基苯基酒石酸	C ₁₁ H ₁₂ O ₇	255.050 5	255.050 0	-2.0	193.05、165.05
3	ESI ⁺	1.36	苯丙氨酸	C ₉ H ₁₁ NO ₂	166.086 8	166.086 8	0.0	120.08、103.05
4	ESI ⁺	2.46	原薯蓣皂苷*	C ₅₁ H ₈₄ O ₂₂	1 071.535 0	1 071.532 0	-2.9	869.49、725.38、579.32
5	ESI ⁺	6.25	薯蓣皂苷元*	C ₂₇ H ₄₂ O ₃	415.321 2	415.322 4	2.9	397.31、271.21、253.20
6	ESI ⁺	6.25	薯蓣皂苷*	C ₄₅ H ₇₂ O ₁₆	869.489 8	869.489 4	-0.6	723.43、577.37、415.32
7	ESI ⁺	6.56	薯蓣次皂苷 A*	C ₃₉ H ₆₂ O ₁₂	723.431 9	723.433 5	2.1	415.32、397.31、253.19

*表示与对照品比对

* indicates comparison with the control substance

表 2 不同缺氧时间的细胞活力

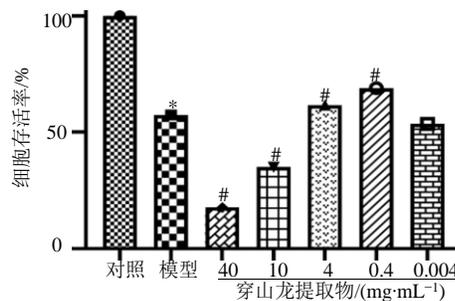
Table 2 Cell viability at different periods of hypoxia

组别	缺氧时间/h	细胞活力/%
对照	0	100
模型	6	70.32 ± 6.90
	8	55.08 ± 5.70*
	12	35.17 ± 2.30*
	16	28.65 ± 0.51*
	24	21.04 ± 0.36*

与对照组比较: * $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs control group

组细胞缺氧 8 h 复氧 2 h 后细胞的存活率明显下降 ($P < 0.05$), 表明造模成功。与模型组比较, 穿山龙醇提取物 40、10 mg/mL 组细胞存活率比模型组还低, 这可能是样品浓度太大有毒性所致。穿山龙醇提取物 0.004 mg/mL 组可能因浓度太低, 对细胞无保护作用没有药效。而穿山龙醇提取物 4、0.4 mg/mL 组的细



与对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: # $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs control group; # $P < 0.05$ vs model group

图 2 不同药物浓度预处理 24 h 的细胞存活率 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Fig. 2 Cell survival rate after 24 h pretreatment with different drug concentrations ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

胞存活率较模型组显著升高 ($P < 0.05$)。

3.4 分子对接结果

本研究采用液质联用技术分离并鉴定了 7 种穿山龙组分, 通过文献查阅总结确定了与穿山龙心肌

缺血功效关系密切的 5 种组分, 分别为薯蓣皂苷元 (diosgenin)、薯蓣皂苷 (dioscin)、对羟基苜蓿基酒石酸 (piscidic acid)、原薯蓣皂苷 (protodioscin)、薯蓣次皂苷 A (prosapogenin A)。心肌缺血相关的靶点信息见表 3。

采用分子对接软件 AutoDock vina 将穿山龙的 5 个组分分别与心肌缺血的 25 个靶标蛋白进行了对接, 结果如表 4 所示。Vina 对接打分以实验结合自由能值为拟合对象, 单位为 kcal/mol, 打分越低表明化合物活性越好^[9]。薯蓣皂苷与 NOS2、SRC、NOS3、MAPK8、COX2、TNF、MAPK1、MAPK14、CASP3、IL-1B、STAT3、HSP70、EGFR、ATP2A2 14 个靶点的对接结果较好。由图 3 可见, 薯蓣皂苷的多个羟基可分别与 GLN263、ASN354、TYR373、ARG381 和 ARG388 形成氢键。薯蓣皂苷元与

COX2、MAPK14、NOS3、SRC、MAPK8、NOS2、EGFR、TNF、CXCL8、MAPK1、CASP3、ATP2A2 结合较好。薯蓣皂苷元占据了 COX2 蛋白中由 ALA202、HIS207、LEU294、HIS388 和 VAL444 等残基形成的疏水空腔, 化合物的六元杂环结构与空腔中的多个疏水残基侧链形成了疏水相互作用。对羟基苜蓿基酒石酸与 HSP70、ATP2A2、NOS3、NOS2、MAPK8、TNF 结合较好。对羟基苜蓿基酒石酸与 HSP70 主要通过氢键进行结合, 其多个羟基和羰基可作为氢键供体或氢键受体与包括 THR15、THR17、LYS73、ASP201、GLY204 和 PRO367 在内的多个蛋白残基主链与侧链形成了氢键网络。薯蓣次皂苷 A 与 NOS2、NOS3、COX2、SRC、CASP3、TNF、MAPK14、MAPK1、MAPK8、IL-1B、EGFR、ATP2A2、BCL2、HSP70、TP53、STAT3、PAR2 17

表 3 心肌缺血相关的靶点

Table 3 Targets associated with myocardial ischemia

序号	靶蛋白名称	基因名	Uniprot ID	PDBID
1	白细胞介素-8	CXCL8	P10145	1ILQ
2	核转录因子	NF-κB1	P19838	1SVC
3	RAC-α 丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶	AKT1	P31749	2UZS
4	诱导性一氧化氮合酶	INOS\NOS2	P35228	3EJ8
5	热休克蛋白	HSP70	P17066	3FE1
6	半胱天冬酶 3	CASP3	P42574	3KJF
7	丝裂原活化蛋白激酶 14	MAPK14	Q16539	3MPT
8	雌激素受体蛋白	ESR1	P03372	3OSA
9	细胞肿瘤抗原 p53	TP53	P04637	3ZME
10	原癌基因酪氨酸蛋白激酶 src	SRC	P12931	4MXZ
11	环氧合酶/细胞色素 C 氧化酶多肽 II	COX2	P35354	5F1A
12	原癌基因蛋白质 C	MYC	P01106	5I50
13	c-Jun 氨基末端激酶	MAPK8	P45983	5LW1
14	肿瘤坏死因子	TNF	P01375	5MU8_1
15	蛋白酶激活受体 2	PAR2	P55085	5NDZ_A
16	丝裂原活化蛋白激酶 1	MAPK1	P28482	5NHF_A
17	白细胞介素-1B	IL1B	P01584	5R8D_A
18	转录因子 AP-1	JUN	P05412	5T01
19	表皮生长因子受体	EGFR	P00533	5UWD_A
20	抗凋亡蛋白	BCL2	P10415	6GL8_A
21	肌浆网钙 ATP 酶	ATP2A2	P16615	6LN5_A
22	信号转导子和转录激活子 3	STAT3	P40763	6NUQ_A
23	内皮一氧化氮合酶	NOS3	P29474	6POY_A
24	血管内皮生长因子 A	VEGFA	P15692	6Z13
25	磷脂酰肌醇 3-激酶调节 α 亚型	PIK3R1	P27986	7CIO

表 4 穿山龙的 5 个成分与 25 个心肌缺血相关靶标对接结果

Table 4 Docking results of five components of *Dioscoreae Nipponicae Rhizoma* with 25 targets related to myocardial ischemia

基因名称	结合能/(kcal·mol ⁻¹)				
	薯蓣皂苷	薯蓣皂苷元	对羟基苜基酒石酸	薯蓣次皂苷 A	原薯蓣皂苷
NOS2	-11.4	-10.1	-7.3	-11.3	-9.9
SRC	-10.9	-10.2	-6.8	-10.2	-8.7
NOS3	-10.6	-10.3	-7.7	-11.1	-11.3
MAPK8	-10.5	-10.2	-7.1	-9.4	-9.8
COX2	-10.4	-10.5	-6.7	-10.6	-9.9
TNF	-10.3	-9.5	-7.0	-9.8	-9.2
MAPK1	-10.0	-9.0	-6.0	-9.5	-8.0
MAPK14	-9.8	-10.4	-6.5	-9.6	-8.3
CASP3	-9.3	-8.6	-6.3	-10.1	-9.3
IL1B	-9.0	-7.8	-5.6	-9.2	-7.1
STAT3	-8.9	-6.8	-5.0	-8.3	-8.3
HSP70	-8.8	-6.9	-8.2	-8.6	-7.4
EGFR	-8.5	-9.8	-6.0	-9.1	-8.8
ATP2A2	-8.4	-8.4	-7.8	-8.7	-10.4
MYC	-7.9	-6.7	-5.3	-7.3	-7.2
VEGFA	-7.8	-7.0	-5.3	-7.5	-7.0
PIK3R1	-7.8	-6.6	-5.1	-7.4	-6.7
PAR2	-7.8	-7.9	-5.8	-8.0	-7.4
CXCL8	-7.8	-9.3	-5.0	-7.8	-6.7
BCL2	-7.8	-7.8	-5.8	-8.6	-8.4
AKT1	-7.8	-6.6	-5.4	-7.4	-7.3
TP53	-7.7	-6.8	-6.5	-8.5	-7.4
NF-κB1	-7.6	-7.4	-5.5	-7.6	-7.1
JUN	-6.8	-6.3	-5.1	-6.7	-6.3
ESR1	-6.6	-6.7	-6.4	-6.8	-6.2

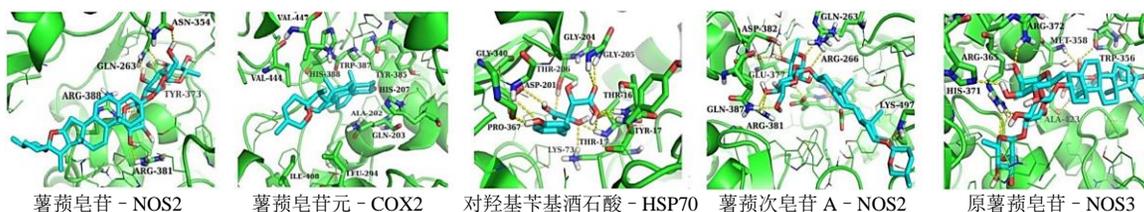


图 3 主要药物成分与靶标的结合模式

Fig. 3 Binding patterns of major drug components and targets

个靶点有作用较好的对接结果, 该化合物不仅可与 NOS2 的 GLN263、ASP382 和 GLU377 等残基形成氢键, 其六元杂环结构与 TRP90、LYS123、THR126、

GLU492、VAL493 等残基侧链形成了疏水接触。与原薯蓣皂苷相互作用较好的靶标有 13 个, 包括 NOS3、ATP2A2、NOS2、COX2、MAPK8、CASP3、

TNF、*EGFR*、*SRC*、*BCL2*、*STAT3*、*MAPK14*、*MAPK1*。原薯蓣皂苷的糖环部分可与 TRP356、MET358、ARG365、HIS371、ARG372 和 ALA423 形成氢键；其六元杂环结构可与 TRP178，PHE353 和 TYR357 等残基形成疏水相互作用。结合能小于 0 则配体与受体可以自由结合，结合能越低表明受体与配体间的亲和力越大，二者发生相互作用的可能性越高。根据对接打分排序得知，5 种化合物均与多个靶点具有较好的相互作用，表明 5 种化合物与相关靶点的结合具有较高的稳定性。

3.5 化合物 - 靶点蛋白网络及网络拓扑分析

利用 Cytoscape 3.6.1 作化合物和靶点蛋白相互作用的网络药理图，结果见图 4。从结构图及拓扑参数可以看出，穿山龙中小分子化合物存在着 1 个化合物与多靶点相互作用的情况，也存在着多个化合物与同一个靶点相互作用的情况，这体现出了中药的多成分能够与多靶点作用的特性。

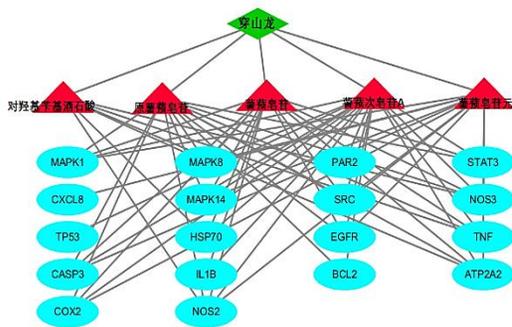


图 4 成分 - 蛋白靶点网络图

Fig. 4 Composition - protein target network diagram

4 讨论

穿山龙作为传统中药具有舒筋活血、止咳化痰、祛风止痛等功效，常用于治疗风湿痛、支气管炎等疾病^[20]。有研究证明穿山龙有抗心肌缺血的作用，然而其作用机制并不明确，同时缺乏分子水平实验研究。本研究采用 UPLC-Q TOF-MS 技术对穿山龙中的主要成分进行鉴定，之后以 H9c2 心肌细胞 H/R 为模型，观察不同浓度穿山龙醇提物对 H/R H9c2 细胞活力的影响。结果显示穿山龙醇提物对 H9c2 细胞 H/R 损伤有保护作用。最后结合分子对接技术对穿山龙多组分的可能作用靶标进行研究，构建了多成分 - 靶点蛋白网络图，对穿山龙治疗心肌缺血作用物质基础及机制进行探索。

本研究基于分子对接技术研究了穿山龙改善心肌缺血的活性成分、潜在作用靶点。NOS2 作为

一种在全身具有多种功能的信使分子通过细胞因子或病原体的应答而表达，它能产生大量的 NO 来调节血管流速、流量，舒张冠脉^[21]。但是当 NO 过量时，过量的 NO 会超氧阴离子结合，引起血栓和心肌细胞损伤。薯蓣皂苷和薯蓣次皂苷 A 与 NOS2 主要通过氢键和疏水作用结合，它们可能通过抑制 NOS2 活性使其维持在适宜浓度从而保护心肌。类似的，NOS3 在激素和物理刺激下会表达生成 NO，NO 扩散到心肌等血管外组织器官中，可刺激可溶性鸟苷酸环化酶生成环状鸟嘌呤单磷酸，导致平滑肌松弛^[22]。同时，由于心衰触发了心肌 NO 生成的变化，从 NOS3 调节 NO 生成转变为诱导型一氧化氮合酶产生的 NO 的过度释放，从而对心肌造成了负性肌力作用^[23]。原薯蓣皂苷通过氢键和疏水键结合于 NOS3 活性部位谷氨酸氨基喹啉附近，可能通过控制 NOS3 浓度达到抑制 NO 生成，从而起到保护心肌的作用。

COX2 是一种序列同源二聚体，可催化花生四烯酸 (AA) 生成前列腺素 (PGG2)，后经过氧化物酶作用 PGG2 可被还原为 PGH2 生成血栓素^[24]；当 COX2 过量时可能引起血栓、心肌缺血、动脉粥样硬化等疾病^[25]。薯蓣皂苷元通过疏水作用力结合于 COX2 的疏水沟槽中，可能通过抑制 COX 活性减少前列腺素的从而保护心肌。

HSP70 是一种能与蛋白分子结合，保护新合成蛋白分子的恰当构型，防止蛋白亚单位不恰当的折叠和聚集的“分子伴侣”。当蛋白质受损变性时，能促使其恢复或加速其降解和消除，以维护细胞的功能和生存^[26]。心肌缺血时，HSP70 可以阻止细胞色素 C 从线粒体释放，从而阻止 Caspase 激酶反应裂解核蛋白和内质网等^[27]，抑制细胞凋亡的发生。对羟基苯基酒石酸通过氢键与疏水作用力结合于 HSP70 的 N 端核苷酸结合域 (NBD) 中，该结合可能正向调控维持 HSP70 浓度，诱导 HSP70 发挥作用防止应激变性蛋白的积累，从而保护心肌。

综上所述，根据体外细胞实验确定了穿山龙具有抗心肌缺血的作用，再利用 UPLC-Q TOF-MS 技术和分子对接关系可以发现穿山龙的多组分均对心肌缺血有治疗作用，尤其是薯蓣皂苷、薯蓣皂苷元、对羟基苯基酒石酸、薯蓣次皂苷和原薯蓣皂苷与多靶点具有较好结合，可能是穿山龙治疗心肌缺血的主要物质。薯蓣皂苷、对羟基苯基酒石酸、薯蓣次皂苷和原薯蓣皂苷主要是通过氢键和疏水

作用与相关靶点相互作用,从而达到保护心肌的作用;薯蓣皂苷元则主要通过疏水占据与靶点结合达到抗心肌缺血的效果。本研究为后续研究穿山龙治疗心肌缺血提供一定的思路和参考。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Gu D C, Qu J Y, Zhang H, *et al.* Revascularization for coronary artery disease: Principle and challenges [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2020, 1177: 75-100.
- [2] 赵永恒,李成刚,戈振凯,等. 基于网络药理学及分子对接探讨延龄草治疗心肌缺血的作用机制 [J]. *中国药理学通报*, 2022, 38(6): 912-919.
- [3] 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 2021 概要 [J]. *心脑血管病防治*, 2022, 22(4): 20-36.
- [4] 中国药典 [S]. 一部. 2015: 267.
- [5] 李德成,刘庆燕,刘春燕. 穿山龙的化学成分和药理作用研究进展 [J]. *山西中医学院学报*, 2016, 17(2): 69-70.
- [6] 于浩,杜建玲. 穿山龙皂苷的药理作用及机制的研究现状 [J]. *中国中药杂志*, 2017, 42(24): 4694-4699.
- [7] Qin J, Kang Y, Xu Z, *et al.* Dioscin prevents the mitochondrial apoptosis and attenuates oxidative stress in cardiac H9c2 cells [J]. *Drug Res*, 2013, 64(1): 47-52.
- [8] Wang P, He L Y, Shen G D, *et al.* Inhibitory effects of dioscin on atherosclerosis and foam cell formation in hyperlipidemia rats [J]. *Inflammopharmacology*, 2017, 25(6): 633-642.
- [9] Wu S, Xu H, Peng J, *et al.* Potent anti-inflammatory effect of dioscin mediated by suppression of TNF- α -induced VCAM-1, ICAM-1 and EL expression via the NF- κ B pathway [J]. *Biochimie*, 2015, 110: 62-72.
- [10] 汪晶晶,刘奕训,文迪,等. 盾叶薯蓣中甾体皂苷及其体外血小板活性研究 [J]. *中国中药杂志*, 2014, 39(19): 3782-3787.
- [11] Zhao X, Yin L, Fang L, *et al.* Protective effects of dioscin against systemic inflammatory response syndrome via adjusting TLR2/MyD88/NF- κ B signal pathway [J]. *Int Immunopharmacol*, 2018, 65: 458-469.
- [12] Tao X, Wan X, Xu Y, *et al.* Dioscin attenuates hepatic ischemia-reperfusion injury in rats through inhibition of oxidative-nitrate stress, inflammation and apoptosis [J]. *Transplantation*, 2014, 98(6): 604-611.
- [13] Ebrahimi H, Badalzadeh R, Mohammadi M, *et al.* Diosgenin attenuates inflammatory response induced by myocardial reperfusion injury: Role of mitochondrial ATP-sensitive potassium channels [J]. *J Physiol Biochem*, 2014, 70(2): 425-432.
- [14] 吴浩,黄蓓蓓,贾志鑫,等. 基于 UHPLC-QTOF-MS/MS 和分子对接筛选紫菀中润肠通便的效应 [J]. *中草药*, 2023, 54(5): 1377-1385.
- [15] 黄启和,周福军,徐旭,等. 基于分子对接技术虚拟筛选延胡索抗心肌缺血物质基础研究 [J]. *中草药*, 2019, 50(10): 2355-2361.
- [16] 卜伟. 一种同时测定不同产地穿山龙药材中四种活性成分含量的方法: 中国, CN109633024A [P]. 2019-04-16.
- [17] Yang H Y, Liu M L, Luo P, *et al.* Network pharmacology provides a systematic approach to understanding the treatment of ischemic heart diseases with traditional Chinese medicine [J]. *Phytomedicine*, 2022, 104: 154268.
- [18] 李德成,刘庆燕,刘春燕. 穿山龙的化学成分和药理作用研究进展 [J]. *山西中医学院学报*, 2016, 17(2): 69-70.
- [19] 陈智勇,车驰,王晓琳,等. 基于网络药理学探讨黄连温胆汤治疗心律失常的机制 [J]. *现代药物与临床*, 2022, 37(8): 1718-1730.
- [20] 徐晓敏,李姗姗,卢芳. 穿山龙复方水煎液对痛风性关节炎合并高尿酸血症诱导痛风性肾病大鼠肾脏的保护作用 [J]. *药物评价研究*, 2022, 45(4): 663-672.
- [21] Garcin E D, Arvai A S, Rosenfeld R J, *et al.* Anchored plasticity opens doors for selective inhibitor design in nitric oxide synthase [J]. *Nat Chem Biol*, 2008, 4(11): 700-707.
- [22] 孙婷,池晴佳,王贵学. NOS3 参与心血管疾病调控机制研究进展 [J]. *生物医学工程学杂志*, 2016, 33(1): 188-192.
- [23] 沈金莲,米亚非,上官娇玲. NOS3 基因 rs1799983 多态性与心衰风险的关系的 Meta 分析 [J]. *心电与循环*, 2021, 40(2): 183-190.
- [24] Orlando B J, Malkowski M G. Substrate-selective inhibition of cyclooxygenase-2 by fenamic acid derivatives is dependent on peroxide tone [J]. *J Biol Chem*, 2016, 291(29): 15069-15081.
- [25] Ferrer M D, Busquets-Cortés C, Capó X, *et al.*

- Cyclooxygenase-2 inhibitors as a therapeutic target in inflammatory diseases [J]. *Curr Med Chem*, 2019, 26(18): 3225-3241.
- [26] White F P, White S R. Isoproterenol induced myocardial necrosis is associated with stress protein synthesis in rat heart and thoracic aorta [J]. *Circ Res*, 1986, 20(7): 512-515.
- [27] 朴松英, 金晓明, 王静, 等. HSP70 在早期心肌缺血中作用的研究 [J]. 哈尔滨医科大学学报, 2003(2): 120-121.

[责任编辑 高源]