

基于网络药理学和分子对接分析丹参酮 I 治疗心肌损伤的作用机制及实验验证

陈阳, 张语琪, 王小莹, 吕彬*

天津中医药大学, 天津 300193

摘要: **目的** 基于网络药理学和分子对接分析丹参酮 I 治疗心肌损伤的作用机制, 并进行实验验证。**方法** 运用网络药理学选取丹参酮 I 治疗心肌损伤的关键靶点, 利用分子对接预测潜在核心蛋白, 并进一步探究丹参酮 I 药效作用, 验证其作用机制。以 300 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 作用 HL-1 细胞建立细胞损伤模型, 模型建立后将细胞分为对照组、模型组、卡托普利组及丹参酮 I 0.1、1、10 $\mu\text{mol/L}$ 组。给药干预 24 h 后用 CCK-8 法和 LDH 法检测细胞活力, F-actin 法检测细胞骨架损伤情况, Elisa 法检测细胞损伤后炎症因子表达。最后通过 Western blotting 验证其对核心蛋白的影响。**结果** 网络药理学预测显示, 丹参酮 I 治疗心肌损伤交集靶点 72 个。通过 PPI 网络筛选得到丹参酮 I 对治疗心肌损伤的关键治疗靶点 7 个, 即表皮生长因子受体 (EGFR)、前列腺素内过氧化物合酶 2 (PTGS2)、丝裂原活化蛋白激酶 14 (MAPK14)、蛋白酪氨酸磷酸酶受体 C (PTPRC)、基质金属蛋白酶 2 (MMP2)、血管内皮生长因子受体 2 (KDR)、沉默调节蛋白 1 (SIRT1)。分子对接筛选出丹参酮 I 治疗心肌损伤核心靶蛋白主要是 PTGS2、MMP2 和 MAPK14。细胞药效结果显示, 丹参酮 I 能显著抑制细胞凋亡率, 改善细胞生长状况及细胞损伤情况, 调控细胞损伤后炎症因子白细胞介素-6 (IL-6)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 水平。Western blotting 结果进一步证实丹参酮 I 通过对核心蛋白 PTGS2、MMP2、MAPK14 的抑制发挥调控作用。**结论** 丹参酮 I 能有效抑制 H_2O_2 诱导的 HL-1 细胞损伤, 其机制可能与调控 PTGS2、MMP2 和 MAPK14 蛋白的表达有关。

关键词: 丹参酮 I; 心肌损伤; 网络药理学; 分子对接; 前列腺素内过氧化物合酶 2; 基质金属蛋白酶 2; 丝裂原活化蛋白激酶 14

中图分类号: R285 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2023)06-1304-09

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2023.06.003

Mechanism and experimental validation of tanshinone I in treatment of myocardial injury based on network pharmacology and molecular docking analysis

CHEN Yang, ZHANG Yu-qi, WANG Xiao-ying, LÜ Bin

Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China

Abstract: Objective The mechanism of tanshinone I in treatment of myocardial injury was analyzed based on network pharmacology and molecular docking, and experimental verification was conducted. **Methods** Network pharmacology was used to select the key targets of tanshinone I in treatment of myocardial injury, and molecular docking was used to predict potential core proteins, and further explore the efficacy of tanshinone I and verify its mechanism of action. HL-1 cells were treated with 300 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 to establish the cell damage model. After the model was established, the cells were divided into control group, model group, captopril group, tanshinone I 0.1, 1, 10 $\mu\text{mol/L}$ groups. After 24 h of intervention, CCK-8 method and LDH method were used to detect cell viability, F-actin method was used to detect cytoskeletal injury, and Elisa method was used to detect the expression of inflammatory factors after cell injury. Finally, Western blotting was used to verify its effect on core proteins. **Results** Network pharmacologic prediction showed that tanshinone I treated 72 intersection targets of myocardial injury. Seven key therapeutic targets of tanshinone I for the treatment of myocardial loss were identified through PPI network screening. Epidermal growth factor receptor (EGFR), prostaglandin endoperoxidase synthase 2 (PTGS2), mitogen activated protein kinase 14 (MAPK14), protein tyrosine phosphatase receptor C (PTPRC), MMP2, vascular endothelial growth factor receptor 2 (KDR), silencing regulatory protein 1 (SIRT1). PTGS2, MMP2 and

收稿日期: 2023-04-18

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2022YFC3500300)

作者简介: 陈阳, 女, 硕士研究生, 研究方向为中药心血管药理。E-mail: 1321871464@qq.com

*通信作者: 吕彬, 博士, 实验师, 从事中药药理研究。E-mail: lyubin@tjutcm.edu.cn

MAPK14 were the core target proteins of tanshinone I in treatment of myocardial injury. The results of cell efficacy showed that tanshinone I could significantly inhibit cell apoptosis rate, improve cell growth and cell damage, regulate the expression of inflammatory cytokines interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) after cell injury. Western blotting results further confirmed that tanshinone I played a regulatory role by inhibiting core proteins PTGS2, MMP2 and MAPK14. **Conclusion** Tanshinone I can effectively inhibit H₂O₂-induced HL-1 cell damage, and its mechanism may be related to the regulation of PTGS2, MMP2 and MAPK14 protein expression.

Key words: tanshinone I; myocardial damage; network pharmacology; molecular docking; PTGS2; MMP2; MAPK14

当前, 心血管疾病已成为全球死亡率最高的疾病, 严重危害人类的健康和生命。据《中国心血管健康与疾病报告 2021》统计, 我国心血管疾病患病人数约为 3.3 亿, 死亡率占全国死亡率的 40%^[1]。心肌细胞的过度凋亡是引起心血管疾病发生的重要原因^[2]。在疾病的发展过程中, 心肌的缺血缺氧是诱导心肌细胞凋亡、坏死, 引起心肌损伤的重要因素, 在心肌梗死等心血管疾病的发生发展过程中发挥着重要作用^[3]。在此过程中会导致大量活性氧[过氧化氢 (H₂O₂)、超氧阴离子自由基等]产生, 产生的过量 H₂O₂ 可以破坏正常的细胞防御机制, 引起细胞膜完整性和通透性的改变, 造成过氧化损伤, 促进心肌细胞凋亡^[4-5]。凋亡的心肌细胞会促使机体产生自身免疫反应, 释放大量的促炎性细胞因子, 早期炎症能够促进白细胞募集到梗死区域, 清除坏死细胞与基质碎片, 有利于梗死愈合; 而过度的炎症反应会加剧心肌损伤, 促进梗死区域外正常心肌细胞的凋亡, 进而引起心肌的纤维化及心肌的动态重构, 使得心肌功能进一步衰竭, 最终发展成为心力衰竭^[6]。因而改善炎症因子减少心肌细胞凋亡和损伤可以明显改善心功能从而降低心肌梗死等缺血性心脏病的发生率。因此, 改善心肌细胞损伤在抑制心血管疾病的发展过程中发挥着极其关键的作用。

随着中医药的不断发展, 关于传统中药治疗心血管疾病的研究逐渐增多。活血化瘀类中药已被证实对心血管疾病具有较好的防治效果, 且不良反应较低, 因此在心血管疾病治疗中占据重要地位^[7]。丹参作为活血化瘀之要药, 具有抗氧化、抗炎、抗凝血、抗动脉粥样硬化、调血脂等药理活性, 其有效成分主要包括以丹酚酸为代表的水溶性成分和以丹参酮为代表的脂溶性成分^[8]。水溶性酚酸类成分由于血管的脂溶性双分子层结构, 主要局限在细胞外液中, 很难或较少向组织器官的细胞内分布, 其功效可能主要表现为血管活性; 脂溶性成分则可广泛分布于生物体中, 具有更广泛的药理活性^[9]。

丹参脂溶性成分的研究主要以丹参酮 II_A 为主, 已被证实具有抗炎、抗动脉粥样硬化、清除氧自由基、改善血流动力学、保护心肌及抑制心肌细胞凋亡等作用, 但其生物利用度低, 难以到达病变部位发挥药效。同为丹参二萜类成分的丹参酮 I 其结构与丹参酮 II_A 类似, 其生物利用度比丹参酮 II_A 高^[10]。目前已证实, 丹参酮 I 主要具有抑制炎症的作用, 能够诱导核因子 E2 相关因子 2 (Nrf2) 信号通路, 激活抗氧化反应, 从而抑制一氧化氮 (NO)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素 (IL)-1 β 、IL-6、核因子- κ B (NF- κ B) 等因子的表达和释放^[12-13]。然而, 丹参酮 I 在心血管疾病的治疗方面研究较少, 仅报道过对阿霉素引起的心脏毒性有治疗作用^[13], 对于治疗心肌损伤的分子机制也尚未明确。因此丹参酮 I 能否作为治疗心血管疾病的药物仍是值得关注的问题。

为此本研究通过网络药理学筛选丹参酮 I 治疗心肌损伤的相关靶蛋白, 并将筛选出的靶蛋白与丹参酮 I 进行分子对接, 探讨丹参酮 I 与靶蛋白的结合情况, 通过结合能选出核心靶蛋白^[14]。随后采用体外细胞实验探究丹参酮 I 的药效作用, 验证其作用机制, 以期为临床治疗心血管疾病药物的开发提供理论基础。

1 材料

1.1 细胞

小鼠心肌细胞 HL-1 细胞购自 ATCC 细胞库。

1.2 主要药品与试剂

丹参酮 I (批号 MUST-20042207, 质量分数 99%) 购自成都曼思特生物科技有限公司; 卡托普利片 (规格 25 mg) 购自宜昌人福药业有限责任公司。PBS 缓冲液 (货号 02-020-1 A)、E-MEM (含谷氨酰胺) 细胞培养基 (货号 C3050-0500)、特级胎牛血清 (FBS) (货号 C04001-500)、青链双抗 (货号 C3420-0100) 购自上海逍鹏生物科技有限公司; CCK8 (货号 CA1210)、乳酸脱氢酶 (LDH) (货号 BC0680)、蛋白酶磷酸酶抑制剂混合物 (货号

P1261)、PMSF (货号 P0100)、高效 RIPA 裂解液 (货号 R0010)、牛血清白蛋白 BSA-V (货号 A8020) 购自北京索莱宝科技有限公司; 小鼠 TNF- α ELISA 检测试剂盒 (货号 YX-201407 M)、IL-6 ELISA 检测试剂盒 (货号 YX-091206 M) 购自上海优选生物科技有限公司; TraKine™ F-actin 染色试剂盒 (绿色荧光) (货号 KTC 4008) 购自 Abbkine 生物技术有限公司; 前列腺素内过氧化物合酶 2 (PTGS2) 抗体 (货号 73315)、基质金属蛋白酶 2 (MMP2) 抗体 (货号 87809)、丝裂原活化蛋白激酶 14 (MAPK14) 抗体 (货号 54470)、磷酸甘油醛脱氢酶 (GAPDH) 抗体 (货号 92310) 购自美国 CST 公司; Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) HRP 抗体 (货号 S 0001) 购自 Affinity 公司。

1.3 仪器

HF151 UV CO₂ 细胞培养箱购自上海 Heal Force 公司; 超净工作台购自苏州净化设备有限公司; 多功能酶标仪购自瑞士 TECAN 公司; 多功能读板机购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司; 高速台式冷冻离心机购自德国 Eppendorf 公司; E 200 型荧光倒置显微镜和非荧光显微镜购自日本 Nikon 公司; ChemiDoc 凝胶成像系统、基础电泳仪电源、小型垂直电泳槽购自美国 Bio Rad 公司。

2 方法

2.1 网络药理学筛选丹参酮 I 治疗心肌损伤的关键靶蛋白

2.1.1 丹参酮 I 治疗靶点的收集 通过 ChEMBL (<https://www.ebi.ac.uk/chembl/>) 中输入 “tanshinone I” 获取丹参酮 I 规范的 SMILES 结构信息, 通过 Swiss Target Prediction 数据库 (<http://www.swiss.targetprediction.ch/>) 收集丹参酮 I 治疗靶点, 在 Uniprot 数据库 (<https://www.uniprot.org/>) 中校正靶点基因名称, 使靶点基因信息与蛋白质标准对应。

2.1.2 心肌损伤相关基因收集 通过 GeneCards 数据库 (<https://www.genecards.org/>)、OMIM 数据库 (<https://omim.org/>)、TTD 数据库 (<http://db.idrblab.net/ttd/>), 以 “myocardial damage” 为关键词进行疾病相关基因查找。将各数据库得到的疾病相关基因进行并集并删除重复基因, 利用 Venny 2.1.0 将丹参酮 I 预测靶点映射到心肌损伤靶标中获得丹参酮 I 治疗心肌损伤的靶点。

2.1.3 蛋白互作 (PPI) 网络分析及关键靶点筛选 在 “STRING” 数据库 (<https://string-db.org/>) 将靶点结

果保存为 TSV 文本输出, 在 Cytoscape 3.9.1 软件中进行网络拓扑学分析, 获取潜在作用靶标之间的 degree 值, 并根据 degree 值绘制潜在作用靶标相互作用网络图。利用 David 数据库 (<https://david.ncifcrf.gov>) 对所得核心靶点进行京都基因和基因组百科全书 (KEGG) 通路富集分析, 以 *P* 值的大小为条件, 选取前 20 个条目做可视化处理。

2.2 分子对接预测丹参酮 I 作用核心靶点

在 PDB 数据库 (<https://www.rcsb.org/>) 和下载相应蛋白和, 用 Chem Draw 软件画出小分子药物结构式, 利用 SYBYL-X 2.1.1 软件优化所下载的蛋白和小分子。利用 AutoDockTools 1.5.6 软件进行分子对接。计算结合能来评估成分小分子与蛋白之间的结合活性, 一般小于 -7.0 kcal/mol (1 cal=4.2 J) 的对接结合能被认为具有良好的结合相互作用。最后运用 PyMOL 2.4.0 软件展示其结合模式。

2.3 体外实验验证丹参酮 I 对心肌损伤的作用

2.3.1 HL-1 细胞培养和处理 使用 MEM 完全培养基 (含 1% 双抗和 10% FBS) 于恒温培养箱中培养。培养过程中, 根据细胞生长状况, 一般 24 h 换液 1 次。取对数生长期细胞进行后续实验。将对数生长期的 HL-1 细胞按照 1×10^5 个/mL 的密度接种于 96 孔板 24 h 后, 分别加入 0、50、100、200、300 $\mu\text{mol/L}$ H₂O₂ 继续培养 24 h。采用 CCK-8 法检测 H₂O₂ 对 HL-1 细胞活力的影响并筛选出最合适的 H₂O₂ 浓度。

2.3.2 细胞分组和处理 将对数期生长的 HL-1 心肌细胞随机分为 6 组: 对照组、模型组、卡托普利组以及丹参酮 I 0.1、1、10 $\mu\text{mol/L}$ 组。待细胞融合度大于 70% 后, 对照组换 MEM 基培培养, 模型组用含有 H₂O₂ 的 MEM 基培进行刺激 24 h, 给药组按照所需浓度加入以含 H₂O₂ (300 $\mu\text{mol/L}$) 的 MEM 基培稀释后不同浓度的丹参酮 I 培养液刺激细胞 24 h。

2.3.3 CCK-8 检测细胞活力 根据 2.3.2 项下细胞分组和处理后, 进行 CCK-8 实验。吸去 96 孔板中原培养液, 每孔加入 10 μL CCK-8 溶液和 90 μL MEM 培养液于 37 $^{\circ}\text{C}$ 中孵育, 刺激 2 h 后, 使用酶联免疫检测仪于 450 nm 波长处测定各孔的吸光度 (A) 值。

2.3.4 LDH 检测细胞活力 根据 2.3.2 项下细胞分组和处理后, 吸取细胞上清培养液进行 LDH 实验。吸取细胞培养基上清液 50 μL 于新的 96 孔板中,

之后加入 50 μL LDH 细胞反应液, 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温箱中孵育 30 min, 加入 25 μL 终止液终止反应, 在 490 nm 波长处测定各孔的 A 值。

2.3.5 F-actin 染色试剂盒检测细胞骨架损伤 根据 2.3.2 项下细胞分组和处理后, 采用 4% 多聚甲醛固定细胞, 进行 F-actin 细胞骨架染色实验。严格按照 F-actin 染色试剂盒的操作说明检测 HL-1 细胞骨架损伤情况。

2.3.6 ELISA 检测细胞炎症因子表达 根据 2.3.2 项下细胞分组和处理后, 离心收集细胞上清培养液进行 ELISA 实验。严格按照 ELISA 试剂盒操作说明检测 HL-1 细胞培养液中的 IL-6 和 TNF- α 水平。

2.3.7 Western blotting 法验证丹参酮 I 对治疗心肌损伤的核心靶蛋白的影响 根据 2.3.2 项下细胞分组和处理后, 收集各组细胞, 采用 RIPA 裂解液提取细胞总蛋白。通过 10% SDS-PAGE 分离胶分离蛋白, 之后将蛋白印迹转移到 PVDF 膜, 加入标记 PTGS2、MMP2 和 MAPK14 抗体 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, TBST 清洗 PVDF 膜后在加入标记二抗孵育 1 h。加 ECL 显影液进行显影。以 GAPDH 作为内参。

2.4 统计学方法

采用 SPSS 20.0 统计软件进行数据统计分析, 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用单因素方差分析 (One-way ANOVA) 进行组间比较, 当方差齐时选用 LSD 检验方法, 当方差不齐时则选择 Dunnett's T 3 检验方法。

3 结果

3.1 丹参酮 I 治疗心肌损伤关键靶点的筛选

如图 1A 所示, 丹参酮 I 对应靶点共 100 个, 通过对疾病数据库的逐一检索共得到心肌损伤相关靶点 4940 个。在 Venn 网站输入相关靶点取交集后, 得到丹参酮 I 治疗心肌损伤的共同作用靶点 72 个。通过 STRING 数据库及 Cytoscape 3.9.1 软件对 72 个交集靶点进行处理后, 根据 degree 值 (表 1) 呈现出网络图 (图 1B、1C), 发现表皮生长因子受体 (EGFR)、PTGS2、MAPK14、蛋白酪氨酸磷酸酶受体 C (PTPRC)、MMP2、血管内皮生长因子受体 2 (KDR)、沉默调节蛋白 1 (SIRT1) 这 7 个靶标 degree 值 ≥ 15 , 排列靠前, 在网络节点中最大且颜色最深, 可能与丹参酮 I 治疗心肌损伤密切相关, 因此选取这 7 个靶蛋白进行后续的分子对接研究。分析丹参酮 I 与心肌损伤共同靶点进行 KEGG 通路富集分析, 根据 P 值进行排序, 得到丹参酮 I 对治

疗心肌损伤的主要相关通路 20 条, 而其中大部分通路与炎症的形成与发展有关, 如 cAMP 信号通路、MAPK 信号通路等, 见图 1D。提示丹参酮 I 可能通过抑制炎症反应发挥对心肌损伤的治疗作用。

3.2 分子对接预测丹参酮 I 作用核心靶点

选择 3.1 项下 PPI 网络图中分析得到的 7 个核心靶点, 运行 AutoDock 软件分子对接。具体对接结合结果见表 2。由表可知, 共有 3 个核心靶点与丹参酮 I 结合能低于 -7 kcal/mol, 分别为 PTGS2、MMP2、MAPK14。对接结合能越低表明丹参酮 I 与蛋白靶点结合亲和力越高, 提示其有更大可能作用于这些靶点, 影响靶点结构发生变化, 进而调控相应的信号通路。将对接后的结果继续分析, 见图 2, 发现丹参酮 I 与 PTGS2 的 GLN-374 位点有氢键相连; 与 MMP2 的 ARG-67 和 HIS-70 位点有氢键相连; 与 MAPK14 的 HIS-148 位点有氢键相连, 进一步说明小分子与 PTGS2、MMP2 和 MAPK14 蛋白之间结合紧密。进而表明, 丹参酮 I 治疗心肌损伤主要是通过调节 PTGS2、MMP2 和 MAPK14 蛋白来实现。

3.3 H₂O₂ 对 HL-1 心肌细胞活性的影响

如图 3 所示, 经 H₂O₂ 处理后, HL-1 细胞生存力随 H₂O₂ 浓度升高呈下降趋势。随着 H₂O₂ 浓度升高, 心肌细胞存活率明显下降 ($P < 0.05$ 、0.01、0.001)。H₂O₂ 浓度为 300 $\mu\text{mol/L}$ 时细胞存活率约为 70%, 既能显著抑制 HL-1 细胞活力, 又不会使大量细胞凋亡, 因此后续采用浓度为 300 $\mu\text{mol/L}$ 的 H₂O₂ 建立 HL-1 心肌细胞损伤模型。

3.4 丹参酮 I 对损伤的 HL-1 细胞的影响

采用 CCK-8 和 LDH 检测细胞活性结果如图 4 所示, 与对照组相比, 模型组细胞活力显著下降、LDH 抑制率显著升高 ($P < 0.001$)。与模型组相比, 丹参酮 I (0.1、1、10 $\mu\text{mol/L}$) 组细胞活力与 LDH 抑制率明显改善 ($P < 0.05$ 、0.01、0.001)。

细胞活力的提高得益于细胞损伤情况的有效改善, 细胞生长状况见图 5。F-actin 染色结果显示, 对照组细胞骨架排列紧密、较为规则, H₂O₂ 刺激会破坏细胞骨架蛋白完整性; 丹参酮 I 能够有效改善这一状况, 且随着浓度的升高, 具有剂量相关性, 见图 6。以上结果表明, 丹参酮 I 能有效缓解 H₂O₂ 诱导的 HL-1 细胞损伤, 并且在测定的浓度 (0.1~10 $\mu\text{mol/L}$) 范围内呈剂量效应关系, 提示丹参酮 I 对 H₂O₂ 诱导 HL-1 细胞损伤具有保护作用。

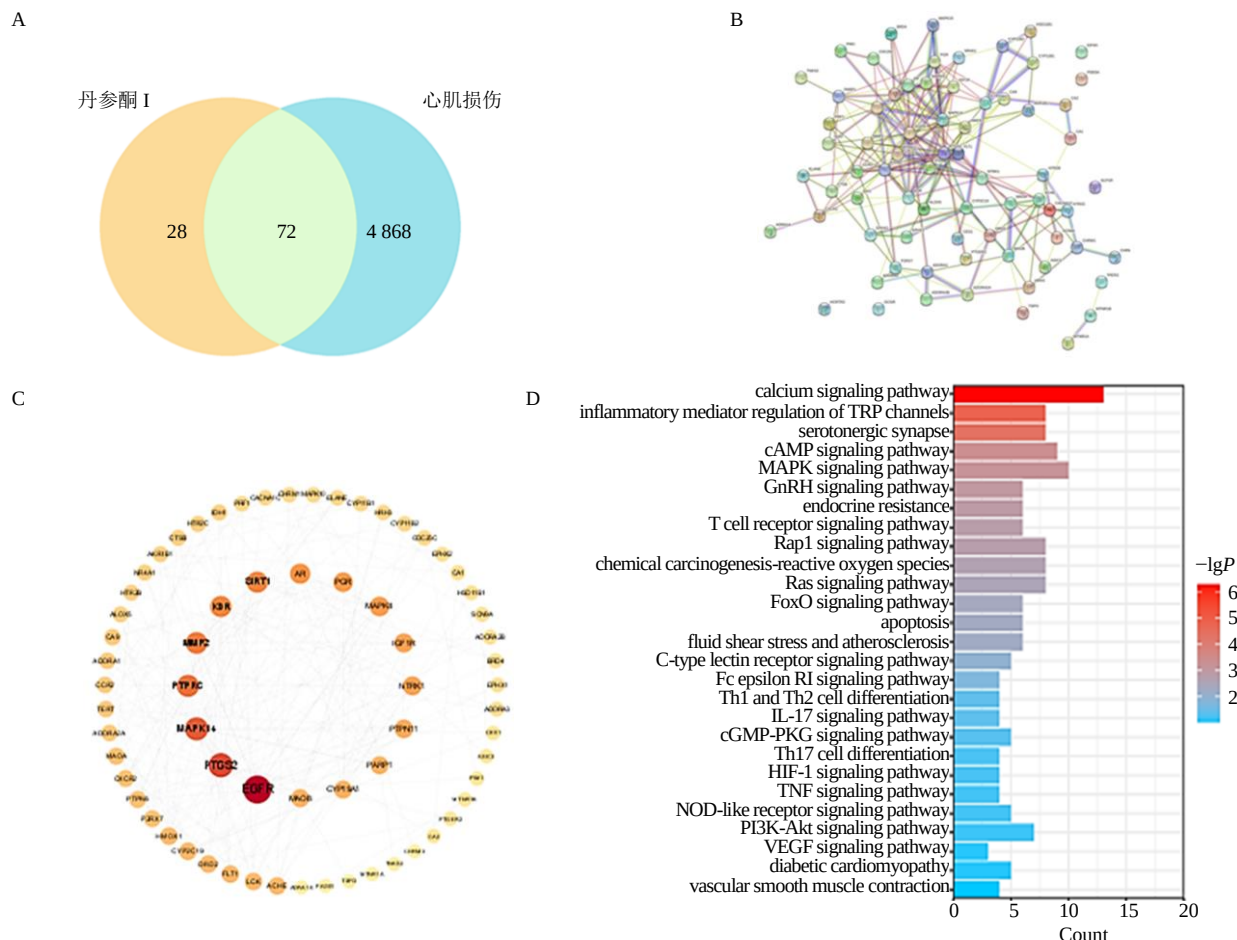


图 1 丹参酮 I 与心肌损伤的交集靶点 (A), 丹参酮 I 治疗心肌损伤潜在靶点 PPI 网络图 (B、C) 及 KEGG 通路富集分析 (D)
Fig. 1 Intersection target of tanshinone I and myocardial injury (A), PPI network diagram of potential targets for tanshinone I treatment of myocardial injury (B, C), KEGG pathway enrichment analysis (D)

表 1 丹参酮 I 与心肌损伤关键靶点 degree 值

Table 1 The degree of tanshinone I and key targets of myocardial injury

排序	关键靶点	degree 值
1	EGFR	28
2	PTGS2	21
3	MAPK14	19
4	PTPRC	17
5	MMP2	16
6	KDR	15
7	SIRT1	15
8	AR	13
9	PGR	12
10	MAPK8	12
11	NTRK1	11
12	IGF1R	11
13	PTPN11	10

表 2 丹参酮 I 与心肌损伤核心靶点分子对接结合能

Table 2 Docking binding energy of tanshinone I and core target molecules of myocardial injury

核心靶点	结合能/(kcal·mol ⁻¹)
EGFR	—
PTGS2	-9.39
MAPK14	-8.03
PTPRC	-5.78
MMP2	-9.32
KDR	-4.93
SIRT1	-6.74

3.5 丹参酮 I 对损伤的 HL-1 细胞炎症因子水平的影响

如图 7 所示, 与对照组相比, 模型组的 IL-6 和

TNF- α 水平明显升高 ($P < 0.001$); 与模型组相比, 丹参酮 I (0.1、1、10 $\mu\text{mol/L}$) 组 IL-6 和 TNF- α 表达均有差异, 且呈剂量相关性 ($P < 0.05$ 、0.01、0.001)。由此可见, 丹参酮 I 能够一定程度上抑制心肌细胞损伤后炎症因子的释放。

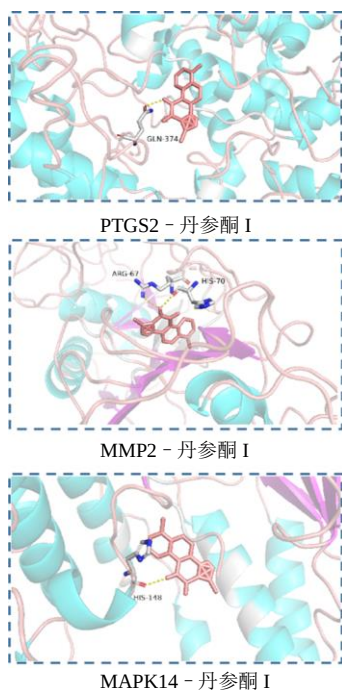
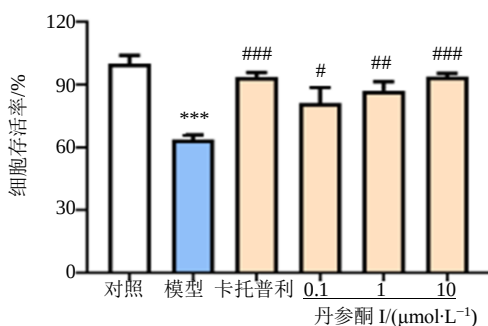
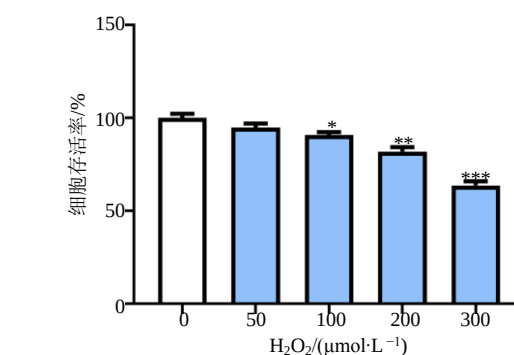


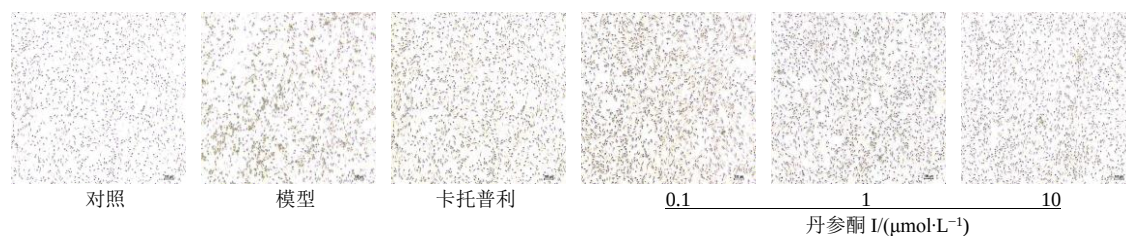
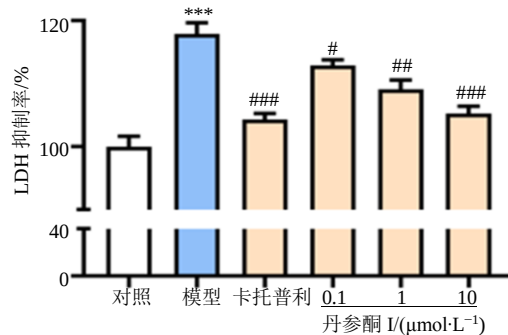
图 2 丹参酮 I 与核心靶点分子对接结构图

Fig. 2 Structure diagram of the docking between tanshinone I and core target molecules

与对照组比较: *** $P < 0.001$; 与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ *** $P < 0.001$ vs control group; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs model group图 4 丹参酮 I 对损伤后 HL-1 细胞的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)Fig. 4 Effect of tanshinone I on HL-1 cells after injury ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs control group图 3 H₂O₂ 对 HL-1 心肌细胞存活率的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)Fig. 3 Effect of H₂O₂ on the viability of HL-1 myocardial cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

3.6 丹参酮 I 对心肌损伤核心靶蛋白表达的影响

如图 8 所示,与对照组相比,模型组的 PTGS2、MMP2、MAPK14 蛋白的表达明显升高 ($P < 0.01$),与模型组相比,丹参酮 I (0.1、1、10 μmol/L) 组的核心靶蛋白 PTGS2、MMP2、MAPK14 表达显著降

图 5 丹参酮 I 对损伤的 HL-1 细胞生长状况的影响 ($\times 40$)Fig. 5 Effect of tanshinone I on the growth of injured HL-1 cells ($\times 40$)

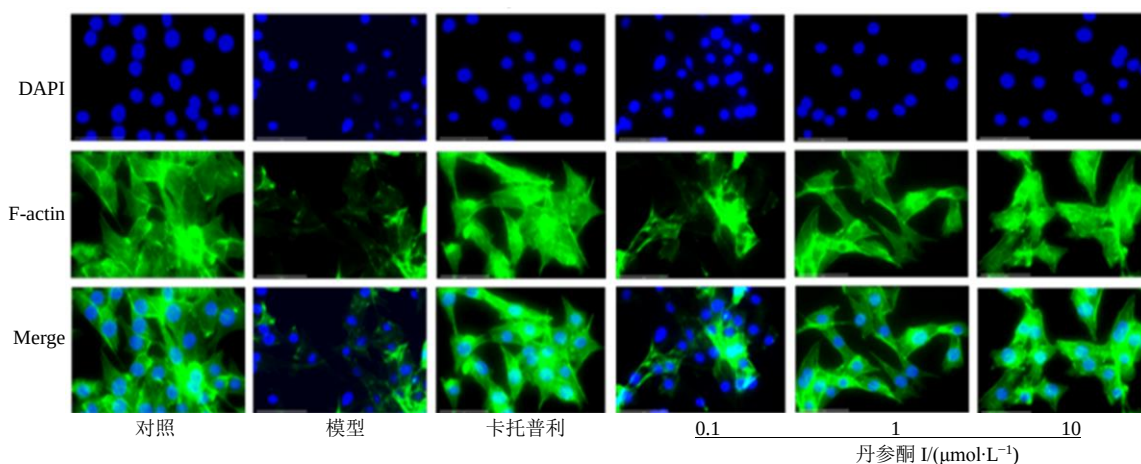
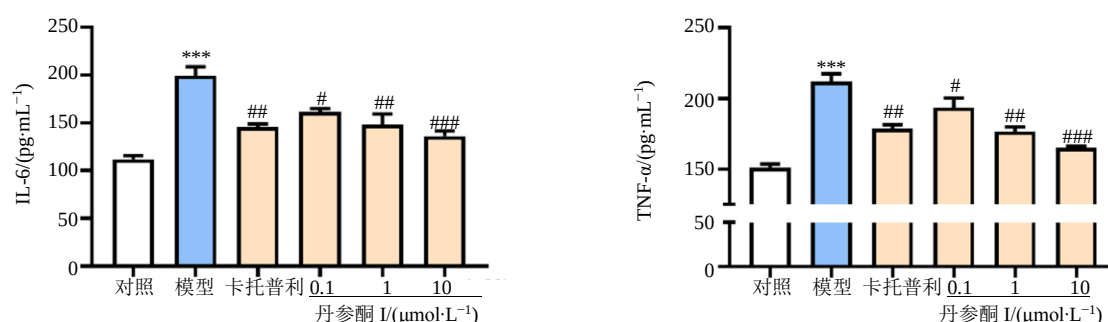


图 6 丹参酮 I 对损伤的 HL-1 细胞骨架的影响 (×400)

Fig. 6 Effect of tanshinone I on injured HL-1 cytoskeleton (×400)



与对照组比较: *** $P < 0.001$; 与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$
*** $P < 0.001$ vs control group; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs model group

图 7 丹参酮 I 对 H_2O_2 诱导后 HL-1 细胞 IL-6 和 TNF- α 表达水平的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Fig. 7 Effect of tanshinone I on the expression level of IL-6 and TNF- α in HL-1 cells induced by H_2O_2 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

低,且具有剂量相关性($P < 0.05$ 、 0.01)。由此可见,丹参酮 I 能够一定程度上抑制心肌细胞损伤后核心靶蛋白 PTGS2、MMP2、MAPK14 的释放。

4 讨论

心肌损伤是多种心血管疾病的病理基础,而心肌细胞损伤是其发生的主要过程之一。研究显示,缺血性心脏病、冠心病、心肌梗死等心血管疾病的发生发展过程中会促使心肌细胞产生大量的 H_2O_2 ,增强氧化应激反应,破坏细胞膜结构,最终导致心肌细胞损伤^[15]。 H_2O_2 作为在氧化应激过程中产生的大量活性氧类型之一,参与调控细胞增殖、基因表达,具有易穿透细胞膜的特点,又因其价格低廉、构建氧化应激细胞模型操作简单,常用于建立体外心肌损伤模型^[16]。HL-1 心肌细胞系是永生化的小鼠心肌细胞系,能够连续分裂并自发收缩,同时保持分化的心脏表型,表现出类似成人心肌细胞的基

因表达谱,近年来常应用于心血管领域研究,以解决细胞和分子水平上的心脏生物学问题^[17]。

本研究利用网络药理学,深入挖掘丹参酮 I 治疗心肌损伤的潜在靶点和作用机制,共筛选到丹参酮 I 治疗心肌损伤的潜在靶点 72 个,并进行 PPI 网络分析筛选出 EGFR、PTGS2、MAPK14、PTPRC、MMP2、KDR、SIRT1 为潜在核心靶点。KEGG 通路富集分析得到丹参酮 I 主要通过 cAMP 信号通路、MAPK 信号通路等炎症通路抑制心肌损伤。然后通过分子对接技术进一步筛选出 PTGS2、MMP2、MAPK14 作为关键核心靶点。PTGS2 是花生四烯酸合成前列腺素酶和血栓素 A2 (TXA2) 的关键酶,主要涉及氧化应激炎症反应,与心肌损伤息息相关,其过度表达会导致血管壁的炎性反应,刺激血管平滑肌细胞的增殖和迁移,从而参与动脉粥样硬化斑块的形成与病变进展^[18]。PTGS2 激活产生前列

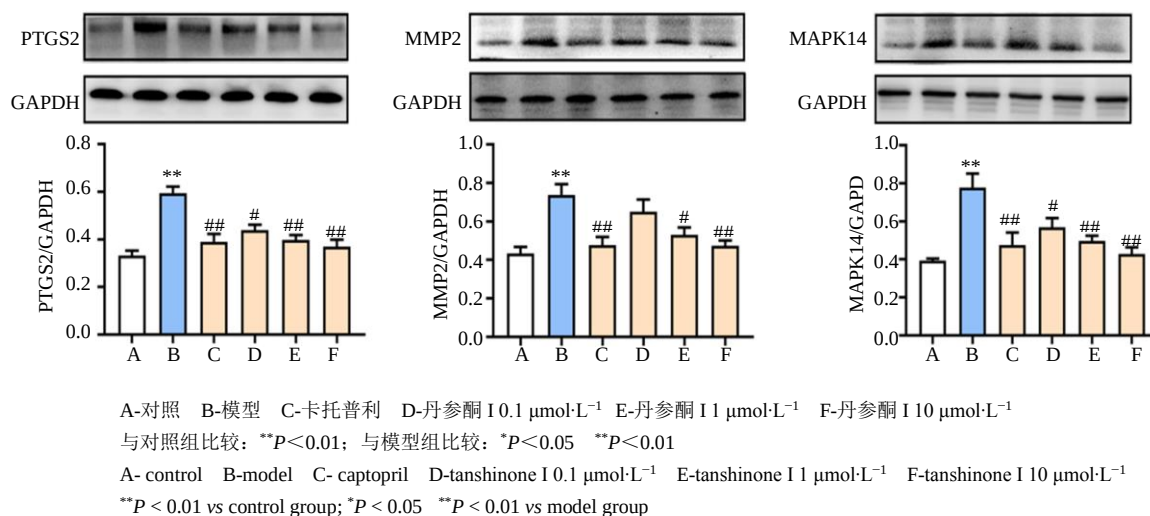


图 8 丹参酮 I 对心肌损伤核心靶蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 8 Effect of tanshinone I on the expression of core target proteins in myocardial injury ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

腺素 E_2 (PGE_2), 引发细胞凋亡、内皮损伤、免疫应答抑制、肿瘤细胞浸润和转移等一系列的细胞信号传导途径, 促进血小板聚集, 进而引发急性冠状动脉综合征。MMP2 在心肌组织中表达水平较高, 是心肌内抗纤维化的重要成分, 广泛作用与细胞外基质 (ECM) 降解过程中, 在心肌梗死后心脏破裂发生进展中起到主要作用^[19]。当氧化应激反应发生后, 大量的活性氧会激活 MMP2, 增加胶原纤维的生成和沉积, 从而促进心肌纤维化的发展^[20]。丝裂原激活蛋白激酶 (MAPK) 是信号从细胞表面传递到细胞核内的重要传递者, 在炎症反应等生理病理过程中起关键作用。MAPK14 又称 p38 MAPK 是促炎基因程序的关键激活因子, 可调节细胞增殖分化、凋亡、衰老和炎症等生物过程, 与氧化应激细胞损伤密切相关, 其影响具有多效性和多样性。总结发现 PTGS2、MMP2、MAPK14 均是与细胞损伤及炎症相关的蛋白。

在丹参酮 I 药效验证实验中, 设置 H_2O_2 浓度梯度处理小鼠 HL-1 心肌细胞, 选择既能有效抑制细胞活力, 又不会使细胞大量死亡的 300 $\mu\text{mol}/\text{L}$ H_2O_2 建立 HL-1 心肌细胞损伤模型。之后通过检测丹参酮 I 干预后心肌细胞损伤模型的细胞活力、生长情况、细胞骨架损伤以及炎症因子表达发现丹参酮 I 能够有效缓解 H_2O_2 诱导的 HL-1 细胞损伤, 并且在测定的浓度 (0.1~10 $\mu\text{mol}/\text{L}$) 范围内呈剂量效应关系, 提示丹参酮对 H_2O_2 诱导的 HL-1 细胞损伤具有保护作用。最后通过 Western blotting 方法验证丹参酮 I 对 PTGS2、MMP2、MAPK14 核心靶蛋白具有

调控作用, 并具有剂量相关性。由此可推断丹参酮 I 是通过对损伤和炎症的整体调控发挥对心肌损伤的治疗作用。

综上所述, 本研究基于网络药理学、分子对接以及体外细胞实验证明了丹参酮 I 能够下调 PTGS2、MMP2、MAPK14 的表达, 有效的改善心肌损伤。因此表明, PTGS2、MMP2、MAPK14 核心靶蛋白可能在丹参酮 I 对治疗心肌损伤过程中发挥了关键作用, 可以作为治疗及预防心肌损伤的新靶点。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

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 2021 概要 [J]. 心脑血管病防治, 2022, 22(4): 20-36.
- [2] 杜美玲, 王晓元, 李会贤, 等. circ_0031739 通过下调 miR-98-5p 促进高糖诱导的心肌细胞损伤 [J]. 中国老年学杂志, 2022, 42(23): 5774-5778.
- [3] 耿栋栋, 苏淑红, 杜慧清, 等. 香叶木苷对异丙肾上腺素诱导的大鼠心脏功能紊乱和氧化应激的影响及其分子机制 [J]. 河南大学学报: 医学版, 2022, 41(2): 103-109.
- [4] Wallace K B, Sardão V A, Oliveira P J. Mitochondrial determinants of doxorubicin-induced cardiomyopathy [J]. Circ Res, 2020, 126(7): 926-941.
- [5] 刘雨佳, 白鹏云, 张磊, 等. 8 周有氧运动对 Nrf2 敲除鼠心肌纤维化的作用及机制 [J]. 天津体育学院学报, 2021, 36(4): 485-489.
- [6] 王圣洁, 孙丽华. 心肌梗死后炎症反应研究现状 [J]. 中国临床药理学杂志, 2021, 37(24): 3374-3378.

- [7] 陈梦, 杨梦灵, 董亚兰, 等. 解毒活血法通过细胞焦亡改善心肌缺血再灌注损伤的研究进展 [J]. 中西医结合研究, 2022, 14(6): 406-410.
- [8] 冯科冉, 李伟霞, 王晓艳, 等. 丹参化学成分、药理作用及其质量标志物(Q-Marker)的预测分析 [J]. 中草药, 2022, 53(2): 609-618.
- [9] 刘慧颖, 姜长涛, 冯娟, 等. 丹参酮类化合物研究进展 [J]. 中国药理学通报, 2016, 32(12): 1643-1647.
- [10] 李兴军, 王江, 柳红. 丹参脂溶性成分结构优化研究进展 [J]. 有机化学, 2023, 43(2): 471-490.
- [11] 杨少君, 周乃珍, 王晓霞. circ_0000285 对过氧化氢诱导的心肌细胞氧化损伤的影响和机制研究 [J]. 岭南心血管病杂志, 2022, 28(6): 568-574.
- [12] Kim S Y, Moon T C, Chang H W, *et al.* Effects of tanshinone I isolated from *Salvia miltiorrhiza* bunge on arachidonic acid metabolism and *in vivo* inflammatory responses [J]. *Phytother Res*, 2002, 16(7): 616-620.
- [13] Jiang Q, Chen X, Tian X, *et al.* Tanshinone I inhibits doxorubicin-induced cardiotoxicity by regulating Nrf2 signaling pathway [J]. *Phytochemistry*, 2022, 106: 154439.
- [14] 牛明, 张斯琴, 张博, 等. 《网络药理学评价方法指南》解读 [J]. 中草药, 2021, 52(14): 4119-4129.
- [15] 姜花, 沈延梅, 马驯凯. 下调 miR-106a-5p 对过氧化氢诱导的心肌细胞损伤及 JAK1/STAT3 通路的影响 [J]. 天津医药, 2023, 51(2): 113-117.
- [16] 徐玲, 许朝祥, 林晓欣, 等. LncRNA RMST 靶向 miR-27a-3p 影响过氧化氢诱导心肌细胞损伤 [J]. 中国细胞生物学学报, 2021, 43(12): 2344-2352.
- [17] 石树青, 殷仕洁, 张雪松, 等. 基于 PGC-1 α /NRF-1/Tfam 探讨茛珀生脉颗粒对 HL-1 心房肌细胞线粒体生物合成的改善作用 [J]. 北京中医药, 2022, 41(10): 1084-1090.
- [18] 史胜楠, 王培利, 刘建勋. 基于网络药理学探讨心脾同治方治疗慢性心力衰竭的作用机制 [J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2021, 19(16): 2673-2681.
- [19] 杨雅雯, 夏敏, 吴芬, 等. Rho 相关卷曲螺旋蛋白激酶 1 在动脉粥样硬化血管壁中的表达及其与基质金属蛋白酶 2 及转化生长因子 1 的相关性 [J]. 中华老年多器官疾病杂志, 2023, 22(1): 53-58.
- [20] 刘会, 张曙影, 袁国军, 等. 尿酸对大鼠血管平滑肌细胞赖氨酰氧化酶和基质金属蛋白酶-2 表达的影响 [J]. 中国循环杂志, 2018, 33(11): 1113-1117.

[责任编辑 高源]