

基于网络药理学和铁死亡探讨牡荆苷改善心肌缺血再灌注损伤的潜在作用机制

王杰, 荀航, 袁海华, 马冬丽, 姜婉莹, 姚曦, 汤锋*

国际竹藤中心 国家林业和草原局竹藤科学与技术重点实验室, 北京 100102

摘要: **目的** 基于生物信息数据库平台, 采用网络药理学方法及分子对接技术研究牡荆苷通过铁死亡途径改善心肌缺血再灌注损伤的分子机制。**方法** 利用多个数据库对牡荆苷的潜在靶点和心肌缺血再灌注损伤的相关靶点进行筛选, 取交集后构建蛋白质相互作用 (PPI) 网络并筛选核心靶点, 对交集靶点进行基因本体 (GO) 功能、京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 通路富集分析, 构建“牡荆苷-靶点-通路”网络并筛选关键核心靶点和通路。进一步对牡荆苷潜在靶点、铁死亡相关靶点、心肌缺血再灌注损伤相关靶点取交集, 并筛选牡荆苷-铁死亡-心肌缺血再灌注损伤相关的关键核心靶点。利用分子对接研究牡荆苷与各关键核心靶点间的结合机制。**结果** 牡荆苷与心肌缺血再灌注损伤的交集靶点共 74 个, 筛选出肿瘤坏死因子 (TNF)、淋巴瘤-2 (Bcl-2)、雌激素受体 1 (ESR1) 等 22 个核心靶点, 主要参与白细胞介素 (IL)-17 通路、脂质和动脉硬化通路等信号通路。分子对接结果表明牡荆苷与各关键核心靶点主要以氢键、范德华力、 π - π 堆积等作用力产生稳定结合。**结论** 牡荆苷通过抑制炎症反应、细胞凋亡及调控铁稳态平衡和氧化应激限制铁死亡等多种生理过程的协同作用来达到改善心肌缺血再灌注损伤的效果。

关键词: 牡荆苷; 心肌缺血再灌注损伤; 网络药理学; 分子对接; 铁死亡; 肿瘤坏死因子; 淋巴瘤-2; 雌激素受体 1

中图分类号: R285 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-5515(2024)05-1123-11

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2024.05.006

Potential mechanism of vitexin in ameliorating myocardial ischemia reperfusion injury by ferroptosis based on network pharmacology

WANG Jie, XUN Hang, YUAN Haihua, MA Dongli, JIANG Wanying, YAO Xi, TANG Feng

International Centre for Bamboo and Rattan, Key Laboratory of National Forestry and Grassland Administration Beijing 100102, China

Abstract: Objective To study the molecular mechanism of vitexin in improving myocardial ischemia reperfusion injury through iron death pathway based on the biological information database platform, network pharmacology, and molecular docking techniques. **Methods** To screen potential targets of vitexin and related targets of myocardial ischemia reperfusion injury by multiple databases. After intersection, PPI network was constructed and core targets were screened. GO function and KEGG pathway enrichment analysis were performed on the intersection targets. Construct the “vitexin-target-pathway” network and screen the key core targets and pathways. Further, the intersection of potential targets of vitexin, iron death-related targets, and myocardial ischemia reperfusion injury related targets was selected, and the key core targets related to vitexin, iron death-myocardial ischemia reperfusion injury were screened. Molecular docking was used to study the binding mechanism between vitexin and key core targets. **Results** A total of 74 intersecting targets of vitexin and myocardial ischemia reperfusion injury were screened out. Among which, 22 core targets including tumor necrosis factor (TNF), lymphoblastoma-2 (Bcl-2) and estrogen receptor 1 (ESR1) were identified, these core targets participate extensively in signaling pathways related to lipid metabolism, atherosclerosis, and the IL-17 pathway. Molecular docking results indicated that vitexin could bind to the tested key targets through hydrogen bonds, van der Waals forces, π - π interactions, and other interactions. **Conclusion** Vitexin can ameliorate myocardial ischemia reperfusion injury by inhibiting inflammatory response, apoptosis, regulating iron homeostasis and limiting iron death through oxidative stress.

Key words: vitexin; network pharmacology; molecular docking; myocardial ischemia reperfusion injury; ferroptosis; TNF; Bcl-2; ESR1

收稿日期: 2023-12-15

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2022YFD2200602)

作者简介: 王杰, 男, 博士生, 主要从事竹藤资源化学利用及反向虚拟筛选研究。E-mail: wangjiekobe@163.com

*通信作者: 汤锋, 男, 博士, 教授, 博士生导师, 主要从事竹藤等生物资源化学利用和植物源农药研究。E-mail: fengtang@icbr.ac.cn

随着社会老龄化加剧, 心血管疾病发病率持续上升且呈年轻化趋势。心肌缺血再灌注损伤是急性心梗采取再灌注治疗后引起的一系列心肌损伤^[1], 包括心肌代谢紊乱、心梗面积增加等, 其机制与细胞凋亡、氧化应激、自噬、炎症反应、内质网应激等生理变化密切相关^[2-3], 涉及多个信号通路, 死亡率较高。目前尚无有效手段来治疗和预防心肌缺血再灌注损伤, 从中药中筛选安全有效预防和改善心肌缺血再灌注损伤药物的手段已成为研究前沿。

牡荆苷是一种广泛存在于药用植物中的 C-糖基化黄酮类化合物, 具有降糖、调脂、抗炎、抗癌及改善氧化应激类疾病等活性^[4-5], 是竹叶中的典型成分之一。目前有研究表明, 牡荆苷对心肌缺血再灌注损伤有明显改善作用^[6-8], 具有开发为心肌保护及预防心肌缺血再灌注损伤药物的潜力, 但是其分子机制尚未明确。网络药理学结合系统生物学、药理学、生物信息学等理论, 为揭示天然产物多靶点、多通路的作用机制提供了可靠的研究方法^[9-11]。分子对接技术可以对化合物与靶标的结合模式和结合亲和力进行模拟分析, 广泛应用于药物作用机理解析和新药设计领域^[12-14]。本研究采用网络药理学和分子对接技术对牡荆苷改善心肌缺血再灌注损伤的潜在分子机制进行研究, 旨在为设计牡荆苷作为治疗心肌缺血再灌注损伤等心血管疾病药物提供科学依据和理论支撑。

1 材料与方法

1.1 牡荆苷的潜在靶点筛选

通过 PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) 数据库得到牡荆苷的 3D 结构和 SMILES 格式文件, 利用 Chem3D 20.0 对牡荆苷的 3D 结构进行能量最小化。综合利用 TCMSP^[15] (<https://old.tcmsp-e.com/tcmsp.php>)、Pharm Mapper^[16-19] (<http://www.lilab-ecust.cn/pharmmapper/>)、SEA^[20] (<https://sea.bkslab.org/>)、Super-Pred^[21] (<https://prediction.charite.de/index.php>)、CTD^[22] (<https://ctdbase.org/>)、SYMMAP^[23] (<http://www.symmap.org/>)、SwissTarget Prediction^[24-25] (<http://www.swisstargetprediction.ch/>) 数据库对牡荆苷进行靶点预测和搜集, 所有数据库参数均选择默认选项, 生成牡荆苷预测靶点信息, 将所得靶点信息进行合并去重, 得到牡荆苷的潜在活性靶点。

1.2 牡荆苷与心肌缺血再灌注损伤交集靶点筛选

使用 “myocardial ischemia reperfusion injury”

作为检索条件, 利用 GeneCards 数据库^[26] (<https://www.genecards.org/>) 和 OMIM 数据库^[27] (<https://www.omim.org/>) 获得心肌缺血再灌注损伤的相关作用靶点, 合并去重处理后利用 Venny 在线工具 (<https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/>) 与牡荆苷靶点取交集, 即为牡荆苷改善心肌缺血再灌注损伤的潜在靶点。

1.3 交集靶点蛋白相互作用 (PPI) 网络的构建

STRING (<https://cn.string-db.org/>) 是一个在线生物数据库, 可以预测 PPI 网络^[28]。将牡荆苷和心肌缺血再灌注损伤的交集靶点导入 STRING 数据库, 物种设置为 “Homo sapiens”, 置信水平设置为 0.400 来获得所需的最小交互分值。通过 Cytoscape 3.7.2 对网络进行可视化, 使用 CytoNCA 插件计算互作网络中的拓扑指数, 包括中介中心性 (BC)、接近中心性 (CC)、度中心性 (DC)、特征向量中心性 (EC)、基于局部平均连接度的方法 (LAC) 和网络中心性 (NC), 以各拓扑指数中位数作为阈值筛选关键靶点。使用 MOCDE 插件获得关键子网络, 与关键靶点取交集得到核心靶点。

1.4 基因本体 (GO)、京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 富集分析

为了对交集靶点的功能和通路进行注释, 使用 DAVID 数据库 (<https://david.ncifcrf.gov/>) 功能标注模块进行 GO 与 KEGG 富集分析, $P < 0.05$ 的 GO 条目和 KEGG 通路被认为显著富集。利用生物信息学在线平台 (<http://www.bioinformatics.com.cn/>) 绘制通路富集分析结果图。

1.5 “牡荆苷 - 靶点 - 通路” 网络构建及拓扑性分析

利用 Cytoscape 3.7.2 对牡荆苷和心肌缺血再灌注损伤的交集靶点及其 KEGG 富集通路结果构建 “牡荆苷 - 靶点 - 通路” 网络, 使用 CytoNCA 插件得到网络拓扑信息, 以 DC 值为主要指标, BC、CC、EC 为次要指标筛选牡荆苷改善心肌缺血再灌注损伤的关键核心靶点及关键核心通路。

1.6 牡荆苷调控铁死亡改善心肌缺血再灌注损伤的作用靶点

由 1.3 项下得到的核心靶点中 10 个靶点和铁死亡调控相关, 为研究牡荆苷调控铁死亡改善心肌缺血再灌注损伤的机制, 将牡荆苷预测靶点、心肌缺血再灌注损伤靶点、铁死亡靶点取共同交集靶点, 其中铁死亡靶点基于 FerrDb V2 数据库^[29] (<http://www.zhounan.org/ferrdb/current/>) 进行搜集。将交集

靶点利用 STRING 数据库进行 PPI 分析, 通过 Cytoscape 3.7.2 进行 PPI 网络构建, 使用 CytoHubaa 插件筛选前 5 个靶点, 即牡荆苷调控铁死亡改善心肌缺血再灌注损伤的关键核心靶点。

1.7 分子对接验证

将牡荆苷改善心肌缺血再灌注损伤的关键核心靶点和牡荆苷调控铁死亡改善心肌缺血再灌注损伤的关键核心靶点分别进行分子对接验证。通过 RCSB PDB (<https://www.rcsb.org/>) 数据库获取各靶点的蛋白结构文件, 利用 Maestro 13.5 的 “protein preparation workflow” 工具对靶标蛋白进行去水、加氢等优化, 利用 “LigPrep” 对牡荆苷的 3D 结构进行优化, 力场均为 “OPLS4”; 通过 “Receptor Grid Generation” 模块进行对接盒子设置, 利用 Glide 模块进行标准精度 (SP) 半柔性分子对接, 以上参数均为默认设置。以 “Glide Gscore” 为得分函数值评价牡荆苷与各靶标蛋白的相互作用, 其值越小表明对接复合物越稳定、结合作用越好, 对接结果使用 Maestro 13.5 和 PyMOL 进行可视化分析。

2 结果

2.1 牡荆苷与心肌缺血再灌注损伤的交集靶点

基于 TCMSP 等 7 个数据库对牡荆苷潜在靶点的预测信息, 经筛选共得到牡荆苷潜在活性靶点 211 个。利用 GeneCards 和 OMIM 数据库筛选获得心肌缺血再灌注损伤的相关作用靶点 2 514 个。对牡荆苷潜在靶点与心肌缺血再灌注损伤相关靶点取

交集, 共得到 74 个交集靶点, 见图 1, 即牡荆苷改善心肌缺血再灌注损伤的潜在靶点。

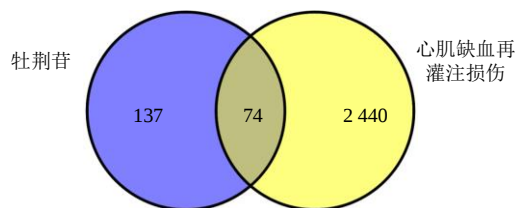


图 1 牡荆苷与心肌缺血再灌注损伤的交集靶点韦恩图

Fig. 1 Venn plot of the intersection targets of vitexin and myocardial ischemia reperfusion injury

2.2 靶点 PPI 网络的构建与分析

利用 STRING 数据库对牡荆苷与心肌缺血再灌注损伤的交集靶点进行 PPI 分析, 得到 PPI 网络。该网络由 74 个节点和 635 条边组成, 表明交集靶点之间具有生物学相关性, 其相互作用以蛋白质间的每条边表示。通过 CytoNCA 插件计算拓扑参数, 根据条件 ($BC > 10.5718$ 、 $CC > 0.5271$ 、 $DC > 13$ 、 $EC > 0.0854$ 、 $LAC > 9.2429$ 、 $NC > 10.6671$) 共筛选得到 29 个靶点 (图 2A); 利用 MCODE 插件进行子网络分析, 共得到 4 个子网络, 其中关键子网络共 23 个靶点, 由 23 个节点和 223 条边组成, 得分为 20.273, 二者取交集绘制 Venn 图 (图 2B), 最终得到包括肿瘤坏死因子 (TNF)、B 淋巴细胞瘤-2 (Bcl-2)、雌激素受体 1 (ESR1) 等 22 个核心靶点 (图 2C), 靶点具体信息见表 1。

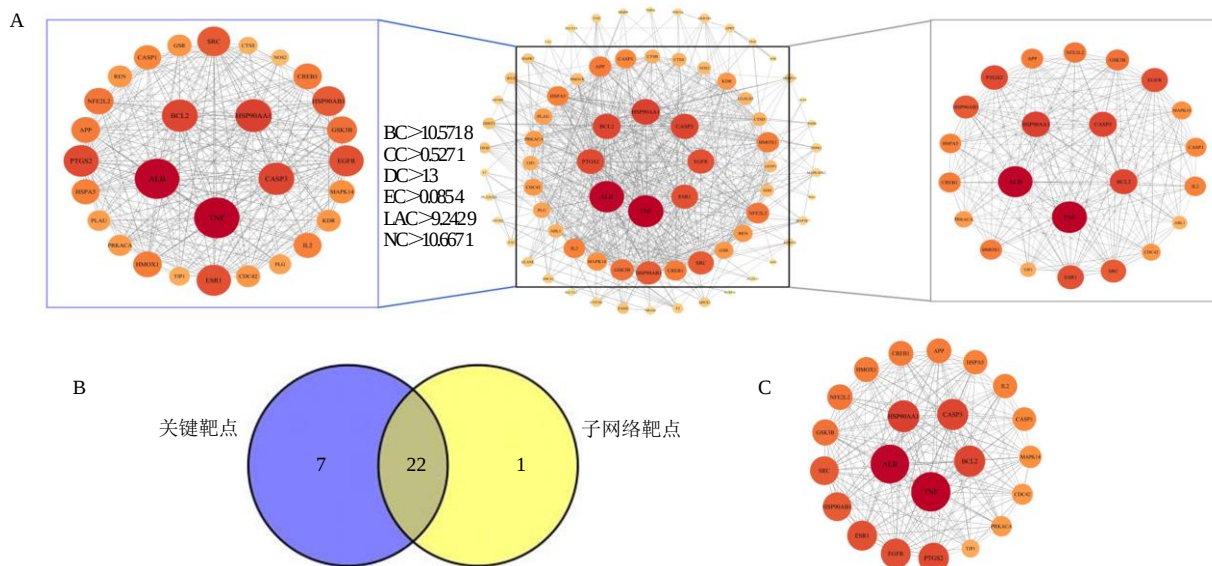


图 2 关键靶点的筛选 (A)、关键靶点与子网络靶点 Venn 图 (B)、核心靶点图 (C)

Fig. 2 Selection of key targets (A), Venn diagram of key targets and sub network targets (B), and core target diagram (C)

表 1 牡荆苷与心肌缺血再灌注损伤交集靶点的核心靶点

Table 1 Core targets of the intersection of vitexin and myocardial ischemia reperfusion injury

靶点	DC	BC	CC	EC	LAC	NC	铁死亡相关
TNF	53	562.750 6	0.784 9	0.241 4	18.264 2	48.417 4	否
Bcl-2	40	107.846 0	0.688 7	0.220 1	20.550 0	34.621 2	否
ESR1	38	232.056 3	0.669 7	0.192 0	16.315 8	28.981 3	否
SRC	36	280.846 3	0.657 7	0.188 8	16.777 8	26.439 7	是
CDC42	24	39.332 7	0.588 7	0.143 5	15.083 3	18.243 0	否
IL-2	29	162.776 0	0.623 9	0.161 3	15.172 4	19.778 0	否
CASP1	28	57.016 8	0.613 4	0.162 9	16.357 1	21.020 3	否
MAPK14	26	172.585 7	0.603 3	0.156 4	16.230 8	19.656 9	是
EGFR	38	224.676 1	0.669 7	0.199 2	17.631 6	30.222 7	是
CASP3	40	134.304 0	0.688 7	0.216 7	19.900 0	34.297 6	否
GSK3B	32	88.546 4	0.634 8	0.179 3	17.437 5	25.243 3	是
APP	30	48.282 9	0.618 6	0.180 2	18.600 0	23.533 5	否
NFE2L2	31	90.693 5	0.629 3	0.170 5	16.387 1	23.821 4	是
HSP90AA1	41	248.966 1	0.695 2	0.208 8	18.146 3	34.821 2	否
PTGS2	39	300.431 8	0.682 2	0.202 6	17.948 7	31.343 4	是
ALB	52	674.645 3	0.776 6	0.233 0	17.576 9	46.725 4	是
HSPA5	29	91.613 4	0.623 9	0.167 1	16.413 8	22.171 2	是
HSP90AB1	36	144.563 3	0.663 6	0.192 1	17.555 6	29.010 4	否
CREB1	30	115.226 4	0.618 6	0.165 1	15.733 3	22.849 0	是
PRKACA	23	52.349 7	0.579 4	0.133 8	13.130 4	16.328 9	否
HMOX1	30	51.318 0	0.629 3	0.176 6	18.133 3	23.984 9	是
TJP1	19	20.602 5	0.570 3	0.124 1	13.263 2	14.465 7	否

2.3 GO、KEGG 富集分析

将牡荆苷与心肌缺血再灌注损伤的交集靶点上传至 DAVID 数据库进行 GO 和 KEGG 富集分析, 显著性水平设为 $P < 0.05$ 。共得到 1451 个 GO 富集条目结果, 其中生物过程 (BP) 为 1286 条, 分子功能 (MF) 为 78 条, 细胞组分 (CC) 为 87 条。分别以 P 值为指标进行筛选, 选择 BP、MF、CC 排

名前 10 位的条目, 见图 3。交集靶点主要参与对化学物质的反应、对内源刺激的反应、对含氧化合物的反应、细胞凋亡过程的调控等 BP; 主要发挥催化活性、酶结合、蛋白质结构域特异性结合、蛋白丝氨酸/苏氨酸/酪氨酸激酶活性等 MF。胞外区部分、囊泡、胞质部分、分泌颗粒等 CC 为交集靶点的反应区域。

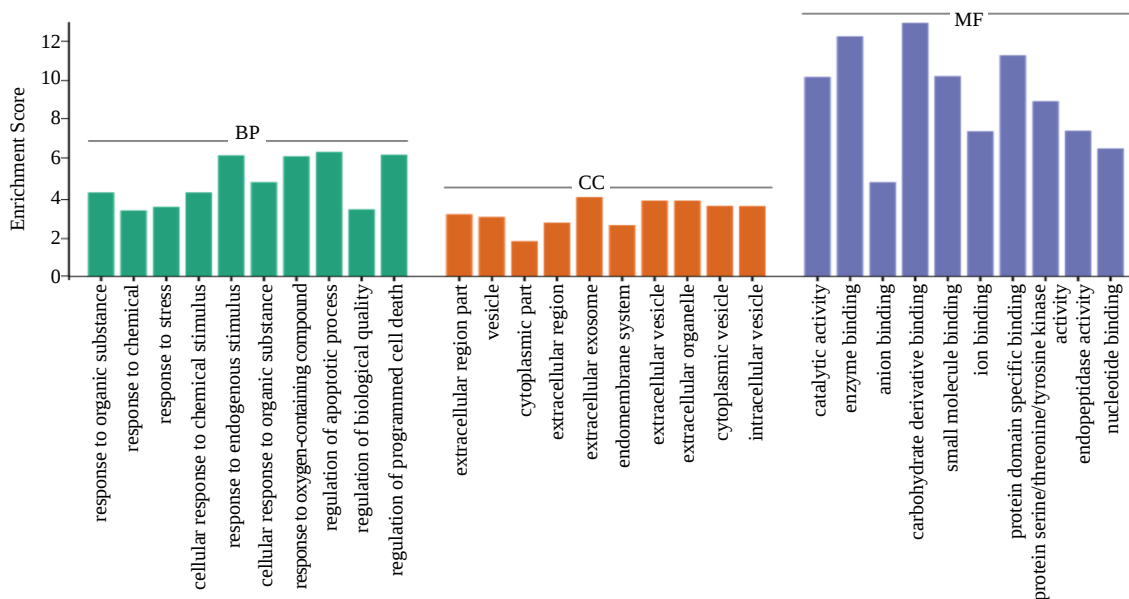


图 3 GO 功能分析

Fig. 3 GO function analysis

KEGG 通路富集结果显示, 共筛选得到相关通路 77 条, 根据 P 值筛选前 16 个条目绘制水平条形图, 见图 4。同时基于前 10 个条目及关联基因绘制桑基气泡图, 见图 5。排名前 10 位的通路分别是脂质和动脉粥样硬化、流体剪切应力与动脉粥样硬化、癌症途径、白细胞介素 (IL) -17 信号通路、神经生长因子信号通路、细胞凋亡、肺结核、癌症中的蛋白聚糖, 另外还有 TNF 信号通路、丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 信号通路、磷脂酰肌醇-3-激酶 (PI3K) /蛋白激酶 B (Akt) 信号通路等通路均与心肌缺血再灌注损伤关联紧密^[3, 30]。

2.4 “牡荆苷-靶点-通路”网络及其拓扑性分析

对牡荆苷和心肌缺血再灌注损伤的交集靶点及其 KEGG 富集通路结果通过 Cytoscape 3.7.2 构建“牡荆苷-靶点-通路”网络 (图 6), 该网络由 71 个节点和 434 条边组成。利用 CytoNCA 插件对“牡

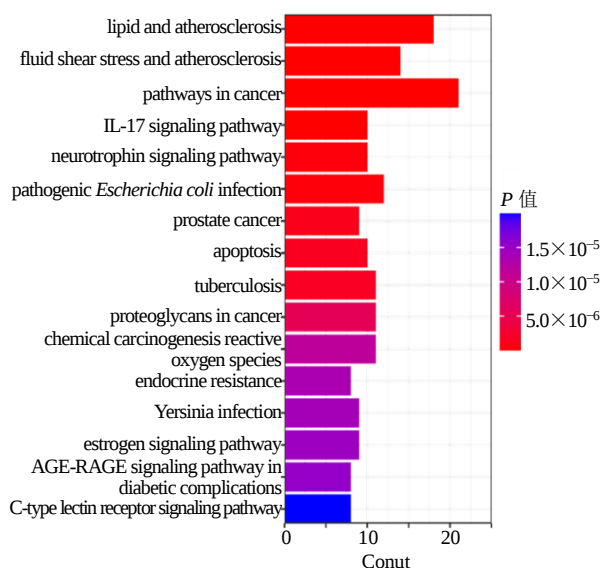


图 4 KEGG 通路分析

Fig. 4 KEGG channel analysis

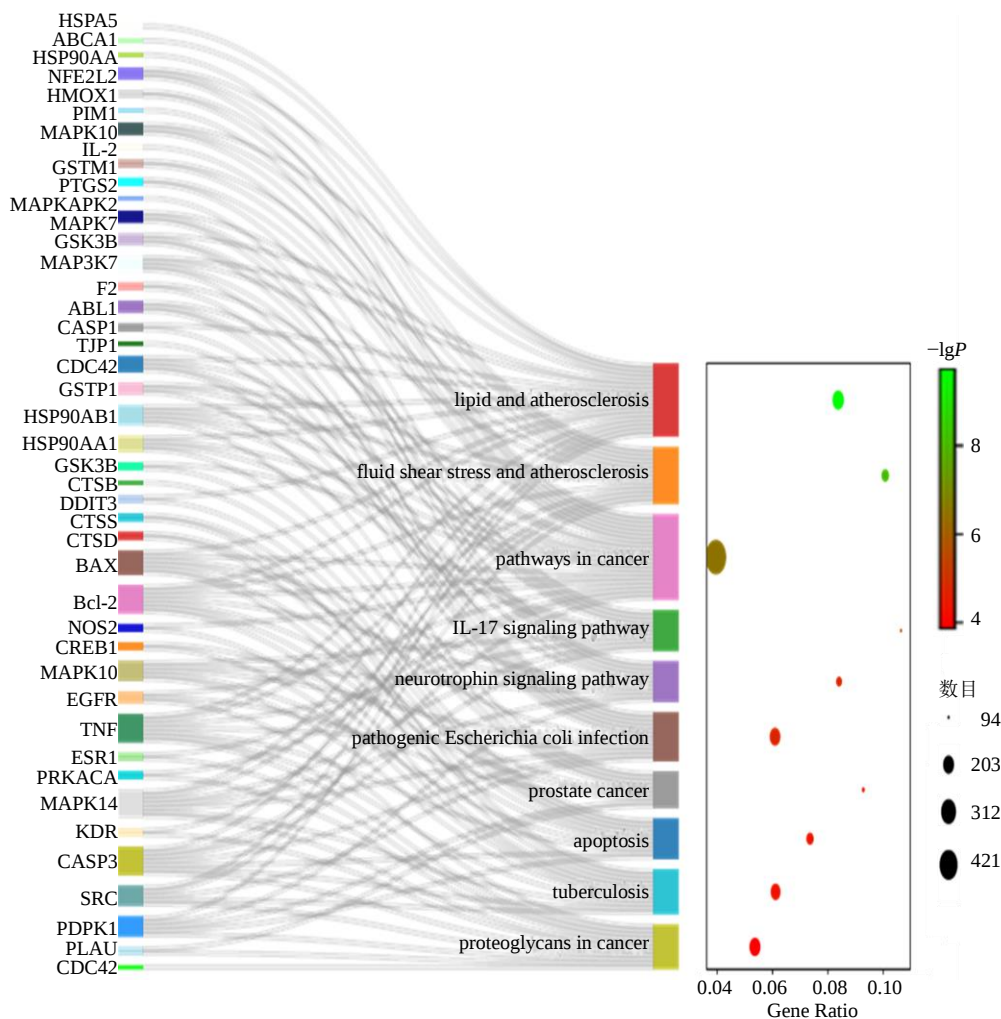


图 5 牡荆苷改善心肌缺血再灌注损伤的交集靶点富集结果

Fig. 5 Enrichment results of the intersection targets of vitexin for ameliorating myocardial ischemia reperfusion injury

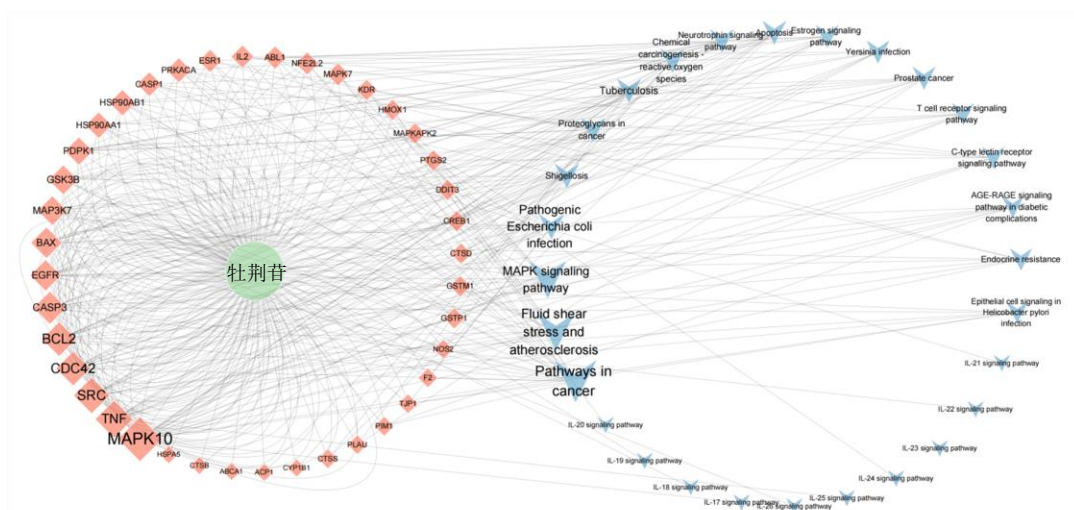


图 6 “牡荆苷 - 靶点 - 通路”网络图

Fig. 6 “Vitexin - target - pathway” network diagram

荆苷 - 靶点 - 通路”网络进行拓扑参数分析,结果显示 MAPK10、TNF、非受体酪氨酸激酶 (SRC)、细胞分裂周期因子 42 (CDC42)、Bcl-2 为连接度最强的 5 个关键核心靶点,它们所在的癌症通路、流体剪切应力与动脉硬化通路、MAPK 信号通路及癌症相关蛋白聚糖通路则是 5 条与牡荆苷作用密切相关的核心通路,见表 2。

表 2 牡荆苷改善心肌缺血再灌注损伤关键核心靶点和关键核心通路

Table 2 Key targets and key pathways involved in the action of vitexin against myocardial ischemia reperfusion injury

名称	DC	BC	CC	EC
MAPK10	34	260.727 0	0.570 1	0.239 5
TNF	26	145.295 4	0.530 4	0.192 6
SRC	24	137.983 6	0.521 4	0.174 3
CDC42	22	97.352 9	0.512 6	0.174 2
Bcl-2	22	116.878 6	0.512 6	0.166 7
pathways in cancer	21	30.906 8	0.504 1	0.202 2
fluid shear stress and atherosclerosis	14	9.819 9	0.451 9	0.161 4
MAPK signaling pathway	12	6.333 5	0.438 8	0.146 0
pathogenic <i>Escherichia coli</i> infection	12	6.699 2	0.432 6	0.156 0
proteoglycans in cancer	11	5.514 6	0.432 6	0.129 6

2.5 牡荆苷调控铁死亡改善心肌缺血再灌注损伤的作用靶点

对 2.2 项下发现的核心靶点分析可以发现其中包括 MAPK14、白蛋白 (ALB)、红细胞衍生核因子

2 样蛋白 2 (NFE2L2)、血红素加氧酶 1 (HMOX1) 等 10 个靶点均为铁死亡相关靶点,见表 1,涉及铁死亡驱动靶点、抑制靶点、标记靶点等类型。

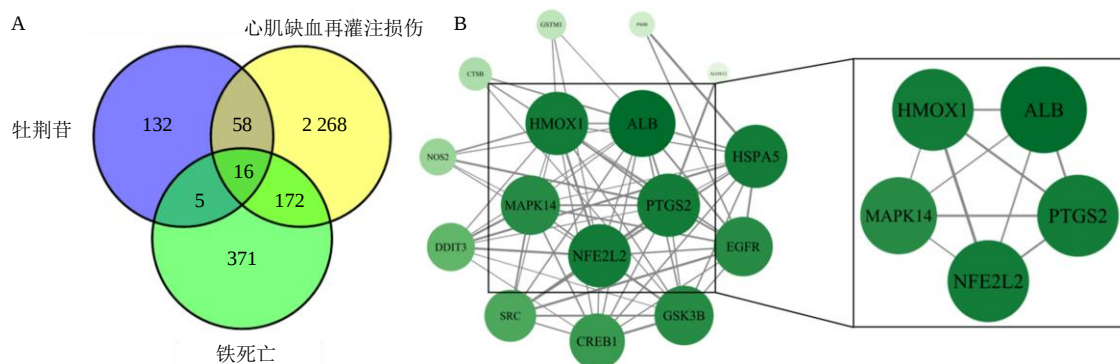
为进一步研究牡荆调控铁死亡改善心肌缺血再灌注损伤的作用机制,将牡荆苷预测靶点、心肌缺血再灌注损伤相关靶点及铁死亡靶点取交集,共得到 16 个交集靶点(图 7A),通过 STRING 数据库进行 PPI 分析后利用 Cytoscape 3.7.2 绘制 PPI 网络图(图 7B),应用 CytoHubba 插件获得了 5 个连接度最高的关键核心靶点,分别为 NFE2L2、ALB、HMOX1、MAPK14、前列腺素内过氧化物合成酶 2 (PTGS2)。

2.6 分子对接验证

为了进一步分析牡荆苷对“牡荆苷 - 靶点 - 通路”网络中的 5 个关键核心靶点及牡荆苷调控铁死亡改善心肌缺血再灌注损伤的 5 个关键核心靶点的结合模式和结合能力,利用 Maestro 13.5 的 Glide 模块对牡荆苷和上述 10 个靶点进行分子对接,获得对接结合能,见表 3。当对接能量小于 -1.2 kcal/mol ($1 \text{ cal} = 4.2 \text{ J}$)^[31],对接结果中所有靶点与牡荆苷对接分数均小于 -1.2 kcal/mol ,表明所有靶点都可以自发与牡荆苷结合,且结合亲和力较强,推测其在牡荆苷改善心肌缺血再灌注损伤的过程中发挥重要作用,具体分子对接模式见图 8。

3 讨论

随着中药现代化的大力推进,从传统中药中筛选具有临床价值的药物活性组分已成为研究热点。牡荆苷作为中药竹叶中典型的黄酮类化合物,因其优良的生物活性已被广泛应用于治疗心血管类疾病



A-牡荆苷、心肌缺血再灌注损伤、铁死亡靶点交集韦恩图；B-牡荆苷调控铁死亡改善心肌缺血再灌注损伤的关键核心靶点筛选。

A-Venn diagram of target intersection of vitexin, myocardial ischemia reperfusion injury and iron death, B-Screening of key core targets of vitexin regulating iron death to improve myocardial ischemia reperfusion injury.

图 7 牡荆苷调控铁死亡改善心肌缺血再灌注损伤的作用靶点筛选

Fig. 7 Screening of the targets of vitexin in regulating ferroptosis to ameliorate myocardial ischemia reperfusion injury

表 3 分子对接结果

Table 3 Result of molecular docking

基因	Uniprot ID	PDB ID	结合能/(kcal·mol ⁻¹)
MAPK10	P53779	7ORF	-9.430 8
TNF	P01375	7JRA	-8.714 0
SRC	P12931	1O4A	-4.760 4
CDC42	P60953	2NGR	-5.146 9
Bcl-2	P10415	6GL8	-4.378 2
NFE2L2	Q16236	7K2K	-4.575 2
ALB	P02768	1N5U	-8.578 1
HMOX1	P09601	5BTQ	-6.783 8
MAPK14	Q16539	5WJJ	-6.901 6
PTGS2	P35354	5IKR	-5.259 5

的研究中。Wan 等^[32]基于均匀设计 (UD) 和逐步回归 (SR) 建模的多目标优化算法,发现虎杖中牡荆苷、荭草苷及槲皮苷的优良组合可以通过提高细胞活力,降低乳酸脱氢酶 (LDH) 的泄漏率和一氧化氮 (NO) 的水平,对缺氧/复氧 (H/R) 诱导的 H9c2 细胞损伤产生显著的心脏保护作用。尽管牡荆苷的代谢途径可能会受到给药方式等多种因素的影响,但目前已有研究表明牡荆苷的体外及体内药理活性显著^[6-7],均对心肌缺血再灌注损伤有保护作用,因此阐明牡荆苷改善心肌缺血再灌注损伤的分子机制,对临床药物设计具有重要意义。

本研究基于网络药理学方法筛选了牡荆苷的潜在活性靶点,并与心肌缺血再灌注损伤相关靶点取

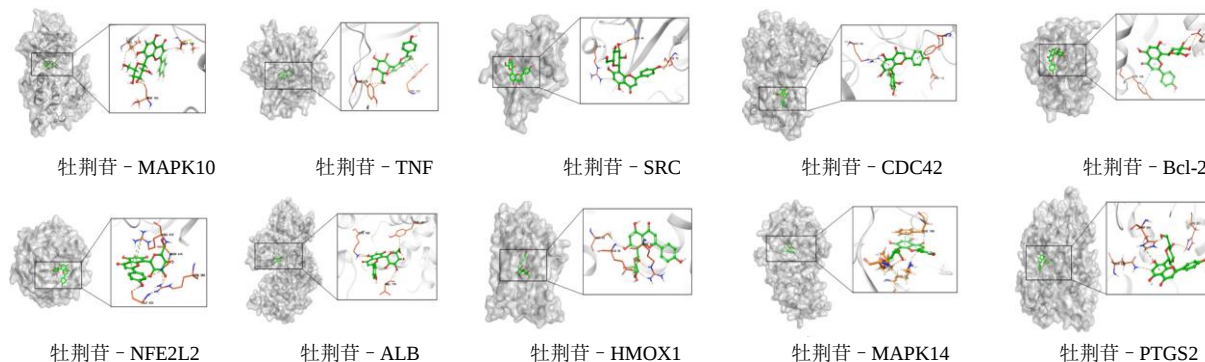


图 8 牡荆苷与各靶点分子对接的结合模式图

Fig. 8 Binding models of vitexin with target proteins

交集得到 74 个共同靶点。通过 STRING 数据库对交集靶点进行了 PPI 分析,构建了 PPI 网络,根据网络拓扑参数筛选得到 22 个核心靶点。其中 TNF 和 IL 可抑制炎症细胞因子 TNF- α 和 IL-1 β 的释放,

通过 Notch1 介导的氧化/硝化应激抑制来降低心肌细胞凋亡等损伤^[33],同时作用 TNF、SRC 和 Bcl-2 可以抑制 NF- κ B 诱导趋化因子和黏附分子并降低白细胞浸润及细胞凋亡,从而发挥改善心肌缺血再

灌注损伤的作用^[34]。富集分析结果表明, 交集靶点主要参与化学物质反应、内源性刺激反应、氧化还原反应、细胞凋亡调控等 BP, 具有催化活性、蛋白激酶活性等 MF, 定位于胞外区、囊泡、分泌颗粒等 CC, 且主要参与脂质和动脉硬化通路、流体剪切应力与动脉硬化通路、癌症通路、IL-17 通路和神经营养因子通路等信号通路。通过对“牡荆苷-靶点-通路”网络进行构建和分析, 得到排名的前 5 位的关键核心靶点为 MAPK10、TNF、SRC、CDC42、Bcl-2, 排名前 5 位的通路有癌症通路、流体剪切应力与动脉硬化通路、MAPK 信号通路、病原大肠杆菌感染通路以及癌症相关蛋白聚糖通路。以上靶点和通路炎症、凋亡及增殖等多个生理过程相关, 在网络拓扑学参数分析中显示出高度的连接中心性, 提示牡荆苷保护心肌免受再灌注损伤的潜在机制与这些靶点和通路高度相关。

进一步对 22 个核心靶点进行分析, 发现其中 10 个靶点参与铁死亡调控。铁死亡是一种铁依赖性的新型的细胞死亡方式, 其本质是由于谷胱甘肽过氧化物酶 (GPX4) 活性下降, 导致 Fe^{2+} 介导的脂质过氧化产生脂质自由基, 引发脂质过氧化链式反应, 破坏细胞膜完整性, 从而引发细胞死亡^[35]。牡荆苷可通过调控铁死亡来改善相关疾病, Guo 等^[36]发现牡荆苷可通过 Keap1/Nrf2/HO-1 信号传导减轻氧化损伤和铁死亡来改善脑缺血再灌注损伤, Zhang Sheng 等^[37]研究表明牡荆苷通过抑制 GPX4 介导的铁死亡来改善糖尿病肾病。目前有研究表明铁死亡与心肌缺血再灌注损伤关联密切^[38-41], 并被认为是治疗心肌缺血再灌注损伤的新靶点。对牡荆苷预测靶点、心肌缺血再灌注损伤相关靶点及铁死亡靶点取交集得到的 16 个靶点构建 PPI 网络, 并筛选得到其中 5 个关键核心靶点 NFE2L2、ALB、HMOX1、MAPK14、PTGS2, 表明牡荆苷可以通过调控多个铁死亡相关靶点来改善心肌缺血再灌注损伤。

分子对接技术可以预测小分子化合物与蛋白靶标之间的结合模式和强弱, 利用分子对接技术分别对牡荆苷与“牡荆苷-靶点-通路”网络中的关键核心靶点及其调控铁死亡改善心肌缺血再灌注损伤的关键靶点进行分析, 结果表明 MAPK10、TNF、SRC、CDC42、Bcl-2 可与牡荆苷形成稳定复合物。其中 MAPK10、TNF 与牡荆苷的结合效果最好, 结合能分别为 -9.430 8、-8.714 0 kcal/mol, 在空间匹配上牡荆苷母核和糖苷均可有效嵌入结合口袋来降

低结合自由能。牡荆苷主要通过 MAPK10 的 Ser193、Ser72、Asn152 及 Met149 等氨基酸残基产生氢键作用力; 其 C 环与 TNF 的 C 链 Tyr135 产生 π - π 堆积, 同时 5 号位羟基可与 C 链 Tyr227 等氨基酸残基产生氢键作用力。MAPK10 属 MAPK 家族, 参与细胞凋亡、增殖等过程, Ser193 和 Ser72 位点的磷酸化对其激酶活性至关重要, Asn152 和 Met149 位于 ATP 结合区, 牡荆苷与之作用可能影响 ATP 的结合从而抑制 MAPK10 的酶活性^[42-44]。TNF 是重要的促炎细胞因子, 其 Tyr135 和 Tyr227 参与 TNF 与受体 TNFR1 的结合, 牡荆苷通过作用于这些关键位点可能降低 TNF 与受体的亲和力, 从而抑制下游促炎通路的激活^[33, 45], 提示牡荆苷可能通过作用 MAPK10 和 TNF 等靶点抑制炎症反应和细胞凋亡从而降低心肌细胞损伤。

而 NFE2L2、ALB、HMOX1、MAPK14、PTGS2 则是牡荆苷调控铁死亡过程以影响心肌缺血再灌注损伤的关键靶点, 其中 ALB 和 MAPK14 与牡荆苷结合自由能最低, 结合能分别为 -8.578 1、-6.901 6 kcal/mol。牡荆苷 C 环羰基与 ALB 的 Lys190 可形成多条氢键, 糖苷部分与 Leu115、Val116、Tyr138 等氨基酸残基均可形成氢键作用力; 其 A 环和 C 环与 Phe169 主要产生 π - π 堆积, 1 号位氧与 Lys53 等氨基酸残基可形成氢键相互作用力, 并且空间匹配度均较好。以上氨基酸残基大多位于 ALB 的 Sudlow I 和 Sudlow II 部位, 是 ALB 与多种内源性和外源性小分子物质发生结合的热点区域^[46-47], 其中 Lys190、Leu115、Val116 和 Tyr138 位于肽链主链区域, 通过与牡荆苷形成非共价相互作用可能会影响 ALB 二级结构和三级结构的构象; 而 Phe169 和 Lys53 位于 ALB Sudlow 部位周边区域, 也可能通过影响局部构象而变化蛋白的整体结合性质^[48-49], 分析表明牡荆苷可能通过多点作用 ALB 关键氨基酸残基, 影响 ALB 与底物的亲和力及其载体功能, 抑制 ALB 与转铁蛋白的协同作用, 来发挥调节铁稳态和抗氧化应激作用, 从而影响铁在细胞内的释放利用来限制铁死亡过程^[50]。MAPK14 是铁死亡的重要驱动靶点之一, 可传导铁诱导的氧化应激和炎症反应加速细胞铁死亡。以上 5 个靶点主要参与调控铁稳态平衡、氧化应激及炎症反应等过程, 因此牡荆苷可能通过调控这些靶点改变铁死亡过程, 进而发挥改善心肌缺血再灌注损伤的作用。

综上, 牡荆苷的 2-苯基色原酮母核结构、8 号

位糖基及 5 号位、4'号位羟基取代基可以与多个心肌缺血再灌注损伤相关靶点的关键氨基酸残基产生结合作用,可能对其发挥改善心肌缺血再灌注损伤的功效非常关键,推测为牡荆苷的关键药效特征结构,对进一步进行基于结构的药物设计、结构修饰和合成生物学研究等均具有重要参考意义。目前牡荆苷的代谢途径及其药代动力学特性尚未被完全揭示,未来的研究可着重于全面阐明牡荆苷在体内的代谢途径,包括主要代谢酶、代谢产物及其药理作用机制。此外,研究不同给药途径对牡荆苷代谢的影响,以及确定其体内过程的关键药代动力学参数,对于指导其临床应用至关重要。同时通过结构修饰或合成类似物,优化牡荆苷的药代动力学特性和药效,将有助于开发更有效的心肌缺血再灌注损伤治疗药物。

本研究利用网络药理学和分子对接手段初步揭示了牡荆苷可与 MAPK10、TNF、ALB 和 MAPK14 等关键核心靶点通过氢键、范德华力、 π - π 堆积等多种分子间作用力稳定结合,并通过作用于癌症通路、流体剪切应力与动脉硬化通路、MAPK 信号通路等通路,抑制炎症反应、细胞凋亡及调控铁稳态平滑和氧化应激等铁死亡途径协同作用达到保护心肌免受再灌注损伤来改善心肌缺血再灌注损伤的潜在分子机制,为后续研究提供了调控铁死亡途径改善心肌缺血再灌注损伤的关键线索,同时为开发心肌缺血再灌注损伤临床药物设计及进一步验证其药理机制提供了新的科学依据和研究思路。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Marchant D J, Boyd J H, Lin D C, *et al.* Inflammation in myocardial diseases [J]. *Circ Res*, 2012, 110(1): 126-144.
- [2] Walters A M, Porter Jr G A, Brookes P S. Mitochondria as a drug target in ischemic heart disease and cardiomyopathy [J]. *Circ Res*, 2012, 111(9): 1222-1236.
- [3] Wang R Y, Wang M, Zhou J H, *et al.* Saponins in Chinese herbal medicine exerts protection in myocardial ischemia-reperfusion injury: Possible mechanism and target analysis [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 11: 570867.
- [4] Peng Y, Gan R Y, Li H B, *et al.* Absorption, metabolism, and bioactivity of vitexin: Recent advances in understanding the efficacy of an important nutraceutical [J]. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2021, 61(6): 1049-1064.
- [5] Babaei F, Moafizad A, Darvishvand Z, *et al.* Review of the effects of vitexin in oxidative stress-related diseases [J]. *Food Sci Nutr*, 2020, 8(6): 2569-2580.
- [6] Xue W, Wang X, Tang H, *et al.* Vitexin attenuates myocardial ischemia/reperfusion injury in rats by regulating mitochondrial dysfunction induced by mitochondrial dynamics imbalance [J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 124: 109849.
- [7] Yang H H, Xue W, Ding C J, *et al.* Vitexin mitigates myocardial ischemia/reperfusion injury in rats by regulating mitochondrial dysfunction via epac1-Rap1 signaling [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2021, 2021: e9921982.
- [8] Dong L Y, Fan Y F, Shao X, *et al.* Vitexin protects against myocardial ischemia/reperfusion injury in langendorff-perfused rat hearts by attenuating inflammatory response and apoptosis [J]. *Food Chem Toxicol*, 2011, 49(12): 3211-3216.
- [9] 汤柳, 陈君茹, 张玲莉, 等. 基于网络药理学和分子对接技术探讨蛇床子治疗湿疹的作用机制 [J]. *现代药物与临床*, 2023, 38(3): 540-546.
- [10] 夏金鑫, 梅茜, 郭爽, 等. 基于指纹图谱和网络药理学对当归四逆汤中桂枝的 Q-marker 预测分析 [J]. *中草药*, 2020, 51(10): 2634-2641.
- [11] Li R, Li Y, Liang X, *et al.* Network pharmacology and bioinformatics analyses identify intersection genes of niacin and COVID-19 as potential therapeutic targets [J]. *Brief Bioinform*, 2021, 22(2): 1279-1290.
- [12] Caballero J. The latest automated docking technologies for novel drug discovery [J]. *Expert Opin Drug Discov*, 2021, 16(6): 625-645.
- [13] Wang W, Xiong X H, Li X, *et al.* In silico investigation of the anti-tumor mechanisms of epigallocatechin-3-gallate [J]. *Molecules*, 2019, 24(7): 1445.
- [14] Park K, Cho A E. Using reverse docking to identify potential targets for ginsenosides [J]. *J Ginseng Res*, 2017, 41(4): 534-539.
- [15] Ru J L, Li P, Wang J, *et al.* TCMSP: A database of systems pharmacology for drug discovery from herbal medicines [J]. *J Cheminform*, 2014, 6: 13.
- [16] Wang X, Pan C X, Gong J Y, *et al.* Enhancing the enrichment of pharmacophore-based target prediction for the polypharmacological profiles of drugs [J]. *J Chem Inf Model*, 2016, 56(6): 1175-1183.
- [17] Liu Q, Zhang A H, Wang L, *et al.* High-throughput chinmedomics-based prediction of effective components and targets from herbal medicine AS1350 [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 38437.
- [18] Wang X, Shen Y H, Wang S W, *et al.* PharmMapper 2017 update: A web server for potential drug target identification

- with a comprehensive target pharmacophore database [J]. *Nucleic Acids Res*, 2017, 45(W1): W356-W360.
- [19] Liu X F, Ouyang S S, Yu B, *et al.* PharmMapper server: A web server for potential drug target identification using pharmacophore mapping approach [J]. *Nucleic Acids Res*, 2010, 38(Web Server issue): W609-W614.
- [20] Keiser M J, Roth B L, Armbruster B N, *et al.* Relating protein pharmacology by ligand chemistry [J]. *Nat Biotechnol*, 2007, 25(2): 197-206.
- [21] Nickel J, Gohlke B O, Erehman J, *et al.* SuperPred: Update on drug classification and target prediction [J]. *Nucleic Acids Res*, 2014, 42(Web Server issue): W26-W31.
- [22] Davis A P, Grondin C J, Johnson R J, *et al.* Comparative toxicogenomics database (CTD): Update 2021 [J]. *Nucleic Acids Res*, 2021, 49(D1): D1138-D1143.
- [23] Wu Y, Zhang F L, Yang K, *et al.* SymMap: An integrative database of traditional Chinese medicine enhanced by symptom mapping [J]. *Nucleic Acids Res*, 2019, 47(D1): D1110-D1117.
- [24] Gfeller D, Michielin O, Zoete V. Shaping the interaction landscape of bioactive molecules [J]. *Bioinformatics*, 2013, 29(23): 3073-3079.
- [25] Daina A, Michielin O, Zoete V. SwissTargetPrediction: Updated data and new features for efficient prediction of protein targets of small molecules [J]. *Nucleic Acids Res*, 2019, 47(W1): W357-W364.
- [26] Stelzer G, Rosen N, Plaschkes I, *et al.* The GeneCards Suite: From gene data mining to disease genome sequence analyses [J]. *Curr Protoc Bioinformatics*, 2016, 54: 1.30.1-1.30.33.
- [27] Amberger J S, Bocchini C A, Schiettecatte F, *et al.* OMIM.org: Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM®), an online catalog of human genes and genetic disorders [J]. *Nucleic Acids Res*, 2015, 43(Database issue): D789-798.
- [28] Szklarczyk D, Gable A L, Lyon D, *et al.* STRING v11: Protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets [J]. *Nucleic Acids Res*, 2019, 47(D1): D607-D613.
- [29] Zhou N, Bao J K. FerrDb: A manually curated resource for regulators and markers of ferroptosis and ferroptosis-disease associations [J]. *Database (Oxford)*, 2020, 2020: baaa021.
- [30] Zhang Q, Wang L, Wang S Q, *et al.* Signaling pathways and targeted therapy for myocardial infarction [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2022, 7(1): 78.
- [31] Ma X Y, Zhao Y, Yang T, *et al.* Integration of network pharmacology and molecular docking to explore the molecular mechanism of Cordycepin in the treatment of Alzheimer's disease [J]. *Front Aging Neurosci*, 2022, 14: 1058780.
- [32] Wan S Q, Zhang J F, Hou R, *et al.* A strategy for component-based Chinese medicines design approach of *Polygonum orientale* L. against hypoxia/reoxygenation based on uniform design-stepwise regression-simulated annealing [J]. *Biomed Pharmacother*, 2021, 135: 111177.
- [33] Pei H F, Song X F, Peng C F, *et al.* TNF- α inhibitor protects against myocardial ischemia/reperfusion injury via Notch1-mediated suppression of oxidative/nitrative stress [J]. *Free Radic Biol Med*, 2015, 82: 114-121.
- [34] Maekawa N, Wada H, Kanda T, *et al.* Improved myocardial ischemia/reperfusion injury in mice lacking tumor necrosis factor- α [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2002, 39(7): 1229-1235.
- [35] Dixon S J, Lemberg K M, Lamprecht M R, *et al.* Ferroptosis: An iron-dependent form of nonapoptotic cell death [J]. *Cell*, 2012, 149(5): 1060-1072.
- [36] Guo L, Shi L. Vitexin improves cerebral ischemia-reperfusion injury by attenuating oxidative injury and ferroptosis via Keap1/Nrf2/HO-1 signaling [J]. *Neurochem Res*, 2023, 48(3): 980-995.
- [37] Zhang S, Zhang S X, Wang H, *et al.* Vitexin ameliorated diabetic nephropathy via suppressing GPX4-mediated ferroptosis [J]. *Eur J Pharmacol*, 2023, 951: 175787.
- [38] Linkermann A, Skouta R, Himmerkus N, *et al.* Synchronized renal tubular cell death involves ferroptosis [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014, 111(47): 16836-16841.
- [39] Zhao W K, Zhou Y, Xu T T, *et al.* Ferroptosis: Opportunities and challenges in myocardial ischemia-reperfusion injury [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2021, 2021: e9929687.
- [40] Jiang X J, Stockwell B R, Conrad M. Ferroptosis: Mechanisms, biology and role in disease [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2021, 22(4): 266-282.
- [41] Han X J, Zhang J, Liu J, *et al.* Targeting ferroptosis: A novel insight against myocardial infarction and ischemia-reperfusion injuries [J]. *Apoptosis*, 2023, 28(1): 108-123.
- [42] Zhang Y N, Yu D J, Li S S, *et al.* Predicting protein-ATP binding sites from primary sequence through fusing bi-profile sampling of multi-view features [J]. *BMC Bioinformatics*, 2012, 13: 118.
- [43] Jiang L H, Rassendren F, Surprenant A, *et al.* Identification of amino acid residues contributing to the ATP-binding site of a purinergic P2X receptor [J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(44): 34190-34196.
- [44] Reynders M, Chaikuad A, Berger B T, *et al.* Controlling

- the covalent reactivity of a kinase inhibitor with light [J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2021, 60(37): 20178-20183.
- [45] Li P, Zheng Y, Chen X. Drugs for autoimmune inflammatory diseases: From small molecule compounds to anti-TNF biologics [J]. *Front Pharmacol*, 2017, 8: 460.
- [46] Fasano M, Curry S, Terreno E, *et al.* The extraordinary ligand binding properties of human serum albumin [J]. *IUBMB Life*, 2005, 57(12): 787-796.
- [47] Wardell M, Wang Z M, Ho J X, *et al.* The atomic structure of human methemalbumin at 1.9 Å [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002, 291(4): 813-819.
- [48] Shaji D. Identification of novel human serum albumin (SA) inhibitors from *Scoparia dulcis* for urolithiasis [J]. *Curr Comput Aided Drug Des*, 2020, 16(3): 308-317.
- [49] Leboffe L, di Masi A, Polticelli F, *et al.* Structural basis of drug recognition by human serum albumin [J]. *Curr Med Chem*, 2020, 27(30): 4907-4931.
- [50] Konopka K, Neilands J B. Effect of serum albumin on siderophore-mediated utilization of transferrin iron [J]. *Biochemistry*, 1984, 23(10): 2122-2127.

[责任编辑 高源]