

基于网络药理学和生物信息学的丹参酮 II_A 治疗冠心病的分子生物学机制分析

徐文华¹, 郑景辉^{1,2*}, 赵 阳¹, 赵新望¹, 董音汝¹, 李 丽¹

1. 广西中医药大学, 广西 南宁 530200

2. 广西中医药大学附属瑞康医院 心内科, 广西 南宁 530011

摘要: **目的** 基于网络药理学和生物信息学方法分析丹参酮 II_A 治疗冠心病 (CHD) 的分子生物学机制。 **方法** 利用 PharmMapper 数据库筛选出丹参酮 II_A 的作用靶点, 利用 OMIM、GeneCards、CTD 数据库筛选 CHD 疾病作用相关靶点。利用 STRING 数据库进行蛋白互作网络分析, 利用 Cytoscape 构建蛋白相互作用网络, 利用 ClueGO 插件进行 GO 分析和 KEGG 信号通路富集分析, 利用 Systemsdock 数据库进行系统分子对接, 利用 iGEMDOCK 软件进行分子对接来预测丹参酮 II_A 对 CHD 作用靶点的结合性。 **结果** 筛选出丹参酮 II_A 的潜在靶点 173 个; 与 CHD 相关的靶点 42 个; 信号通路 49 条。 **结论** 丹参酮 II_A 治疗 CHD 具有多靶点、多通路作用的特点; 其可能作用机制是通过调控 CHD 发展过程中的血压调节、细胞代谢、血管新生、内分泌、活性氧代谢等过程对 CHD 进行干预。

关键词: 丹参酮 II_A; 冠心病; 网络药理学; 生物信息学; 分子对接

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2019)05-1131-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.05.016

Molecular biological mechanism of tanshinone II_A in treatment of coronary heart disease based on network pharmacology and bioinformatics

XU Wen-hua¹, ZHENG Jing-hui^{1,2}, ZHAO Yang¹, ZHAO Xin-wang¹, DONG Yin-ru¹, LI Li¹

1. Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530200, China

2. Department of Cardiology, Rukang Hospital, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530011, China

Abstract: Objective To analyze the molecular biological mechanism of tanshinone II_A in the treatment of coronary heart disease (CHD) based on network pharmacology and bioinformatics methods. **Methods** The targets of tanshinone II_A were screened by uploading the chemical structure to PharmMapper database. Related targets of CHD were screened by OMIM, GeneCards, and CTD databases. The above data were imported into STRING database for PPI network analysis. Protein interaction network was constructed using Cytoscape. Gene Ontology analysis and enrichment analysis of KEGG signaling pathway were performed by Cluego. Systemsdock database was used for system molecular docking, and iGEMDOCK software was used for molecular docking to test the binding of tanshinone II_A to the targets of coronary heart disease. **Results** A total of 173 possible potential targets of tanshinone II_A, 42 targets related to CHD and 49 signal pathways were identified. **Conclusion** Tanshinone II_A has the characteristics of multi-target and multi-pathway in the treatment of CHD, and its mechanism may be through the regulation of blood pressure, cell metabolism, angiogenesis, endocrine, reactive oxygen metabolism, and other bioprocesses during the development of CHD.

Key words: tanshinone II_A; coronary heart disease; network pharmacology; bioinformatics; molecular docking

冠状动脉粥样硬化性心脏病简称冠心病 闭塞导致心肌缺血、缺氧或坏死而引发的心脏病^[1]。
(CHD), 是指由于冠状动脉粥样硬化使管腔狭窄或 根据《中国心血管病报告 2017》, 2015 年中国城市

收稿日期: 2018-10-16

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81660776); 广西自然科学基金资助项目 (2016GXNSFAA380296); 广西中医药大学研究生教育创新计划项目 (YCSW2018171); 2018 年广西壮族自治区财政资助博士学位授予单位立项建设项目 (桂学位 [2018] 5 号)

作者简介: 徐文华 (1995—), 女, 山东淄博人, 在读硕士, 主要研究方向为生物信息学在中医药研究中的应用。

***通信作者** 郑景辉 (1976—), 男, 山东滨州人, 教授, 博士, 硕士生导师, 主要研究方向为生物信息学在中医药研究中的应用。

E-mail: jinghuizheng@yeah.net

和农村居民 CHD 死亡率继续 2012 年以来的上升趋势,农村地区 CHD 死亡率明显上升。城市 CHD 发病率高于农村,城市地区下降趋势明显,农村地区呈上升趋势^[2]。

丹参酮 II_A 是丹参的主要药效成分之一,具有对血管、血流的双重调节作用,能够减少血管内膜的增生,提高组织血流灌注、改善肾脏的微循环^[3],但其作用分子作用机制尚不明确。网络药理学及生物信息学的建立,使得研究中药的潜在成分及其作用基因靶点具有了可用的研究策略^[4-7]。本研究通过对丹参酮 II_A 中作用靶点和 CHD 相关的疾病靶点进行筛选汇总,得出丹参酮 II_A 作用于 CHD 的作用交联靶基因,并且进行生物信息学分析得到丹参酮 II_A 分子作用机制。

1 材料与方法

1.1 丹参酮 II_A 化学成分靶点预测

使用 TCMSP 数据库 (<http://lsp.nwu.edu.cn/>) 收集丹参酮 II_A 药效成分信息,保存为 mol2 格式文件。将 TCMSP 中筛选出的丹参酮 II_A 化学成分分子结构以 mol2 的格式上传 PharmMapper 数据库^[8-10] (http://lilab.ecust.edu.cn/pharmmapper/submit_file.php)。基于反向药效团匹配法,选择药物的药效团模型,设置最终产生 300 个蛋白构象,得到与化合物相关的靶点名称、基因名称、Uniprot ID、匹配值 (fit score) 等结果。对化合物预测产生的相同靶点进行筛选剔除,录入 UniProt (<https://www.uniprot.org/>) 数据库中检索,选择物种为“Homo sapiens”,剔除重复、非人源与不规范的靶点,经检索和转化操作最终得到丹参酮 II_A 活性成分的基因靶点。结合文献报道查找丹参酮 II_A 已报道的靶点进行筛选补充。

1.2 丹参酮 II_A 化学成分靶点蛋白互作 (PPI) 网络的构建

为了说明靶点蛋白在系统上的作用,将“1.1”项所得的丹参酮 II_A 潜在靶点信息上传 STRING 10.5 在线软件 (<http://string-db.org>),限定研究物种为人类,获得 PPI 网络图。STRING 数据库是一个储存已知的和预测的蛋白质相互作用的数据库,包含蛋白间直接的和间接的相互作用,并对每个蛋白相互作用信息进行评价赋分,分值越高,蛋白相互作用置信度越高^[11],从而得出蛋白互作信息。将从 STRING 数据库导出的文件中 node1、node2 和 Combined score 信息导入 Cytoscape3.6.1 软件进行可视化分析,并得到网络分析结果。进一步设置节

点大小与颜色反映度 (degree) 值大小,边的粗细反映 Combined score 大小,最终获得 PPI 网络。

1.3 丹参酮 II_A 与 CHD 相关靶点的收集

分别在 CTD (<http://ctd.mdibl.org/>)、OMIM (<http://www.omim.org/>)、GeneCards (<https://www.genecards.org/>) 数据库检索 CHD 相关靶点,筛选并删除重复靶点基因,与“1.2”项获得的靶点进行交集比对,最终获得丹参酮 II_A 治疗 CHD 的潜在作用靶点。

1.4 相关通路和注释分析

以 Gene Symbol 的格式导入 David 6.8 数据库 (<https://david.ncifcrf.gov/>) 中,分别勾选生物过程 (biological process, BP)、分子功能 (cellular component, CC)、细胞成分 (molecular function, MF)。利用 Cytoscape3.6.1 中 Clue GO 插件,进行 KEGG 通路分析。其中 Clue GO 插件关联 KEGG、Wikipathways、Reactome 数据库中的信号通路及代谢网络,综合预测丹参酮 II_A 与 CHD 关键调控通路。选择“KEGG-Pathway”得到相关数据,利用公式计算出富集因子 (rich factor, 目标基因集中属于该通路的基因数量/背景基因集中该通路所有基因的数量),并绘制气泡图。

1.5 网络靶点特性分析

运用 Cytoscape 3.6.1 软件中插件 Network Analyzer 计算网络的拓扑参数。网络中节点之间如存在调控作用关系则以边相连。本研究基于平均最短路径、介数中心性、中心接近度、聚类系数、度值等参数评估节点在全网络中的关键性。

1.6 成分-靶点分子对接

1.6.1 系统分子对接 (Systemsdock) System Dock Web Site (<http://systemsdock.unit.oist.jp/iddp/home/index>) 数据库,是一个基于网络药理学的预测和分析的 Web 服务器,它应用高精度对接模拟和分子路径图来综合表征配体选择性,并说明配体如何作用于复杂的分子网络。系统对接应用 AutoDockVina 进行对接模拟,预测蛋白质和配体结合的性能,调整 X-Y-Z 坐标和网格大小以细化绑定的位置^[12]。对接结果的分数是实验解离/抑制常数值 (PKD/PKI) 的负对数, docking scores 的值通常为 0~10。登陆 System Dock Web Site 数据库,将丹参酮 II_A 治疗 CHD 的潜在的 42 个作用靶点蛋白输入 PDB ID,找活性位点,计算格点,调整 X-Y-Z 坐标来细化位置。输入丹参酮 II_A 的分子结构,成功后开始对接,整理对接结果中的 docking scores 并分析。

1.6.2 iGEMDOCK 分子对接 iGEMDOCK 是一个开源的分子对接软件, 使用 iGEMDOCK, 由 GEMDOCK 生成的预测结果能够被分子可视化工具直接可视化, 并且通过后分析工具进行分析。iGEMDOCK 通过基于对接位点 (即蛋白质-配体相互作用) 和化合物性质 (即原子组成) 使用 k-均值和分层聚类方法提供后分析工具, 操作简单, 可以直接导入配体分子进行对接, 并且允许多个配体同时进行对接, 一般用于活性筛选和快速对接。其结果以能量的高低去判断与化合物结合程度, 一般化合物分子与受体结合的构象稳定时能量越低, 发生的作用可能性越大。在 PDB (<https://www.rcsb.org/>)

中搜索 42 个共有靶点蛋白并保存为 PDB 格式。配体丹参酮 II_A 以 mol2 格式上传, 设置软件为默认参数: generic evolutionary method 为 200, generation 为 70, number of solution 为 2。

2 结果

2.1 丹参酮 II_A 的化学结构及其潜在靶点信息

根据 PharmMapper 数据库以及经过文献检索查找丹参酮 II_A 已报道的靶点最终得到丹参酮 II_A 的潜在靶点 173 个, 其中包括 MAPK1、TNF、MAPK3、CASP8、MAPK8 等。丹参酮 II_A 的靶点相互作用见图 1。关系网络中节点详细信息见表 1 (仅列靶点度值最高的前 30 个靶点)。

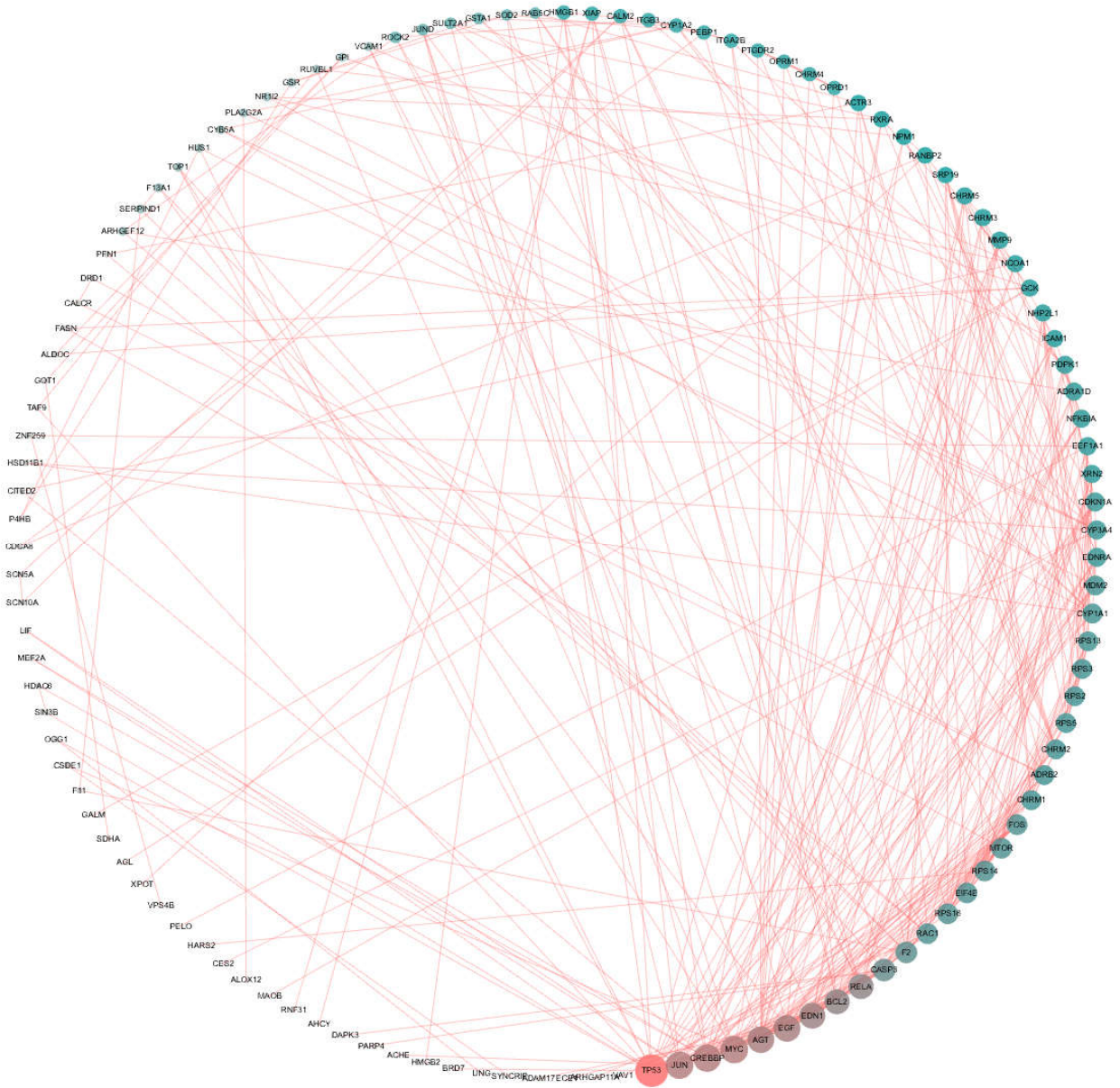


图 1 丹参酮 II_A 蛋白互作网络

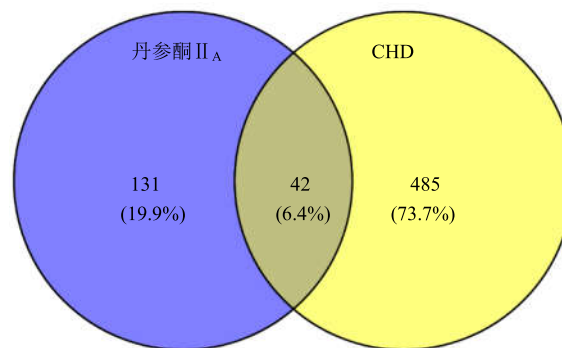
Fig. 1 Tanshinone II_A protein interaction network

表 1 丹参酮 II_A 蛋白互作拓扑学分析 (度值排序前 30 个靶点)Table 1 Topological analysis of tanshinone II_A protein interaction (top 30 targets in degree ranking)

蛋白名称	平均最短路径	介数中心性	中心接近度	聚类系数	度值
TP53	2.339	0.216	0.428	0.210	25
CREBBP	2.331	0.224	0.429	0.234	19
JUN	2.483	0.063	0.403	0.310	19
MYC	2.390	0.140	0.418	0.339	19
EGF	2.517	0.137	0.397	0.268	18
AGT	2.805	0.095	0.356	0.281	18
EDN1	2.678	0.077	0.373	0.309	17
RELA	2.576	0.059	0.388	0.325	16
BCL2	2.441	0.054	0.410	0.425	16
CASP3	2.568	0.080	0.389	0.372	13
F2	3.169	0.043	0.316	0.394	12
RPS14	3.669	0.029	0.273	0.673	11
RPS16	3.525	0.040	0.284	0.673	11
FOS	2.534	0.030	0.395	0.527	11
EIF4E	2.907	0.185	0.344	0.436	11
MTOR	2.525	0.064	0.396	0.382	11
RAC1	3.051	0.061	0.328	0.145	11
ADRB2	3.085	0.038	0.324	0.356	10
RPS13	3.678	0.012	0.272	0.822	10
MDM2	2.686	0.030	0.372	0.422	10
CHRM2	3.161	0.019	0.316	0.422	10
RPS3	3.678	0.012	0.272	0.822	10
RPS5	3.678	0.012	0.272	0.822	10
CHRM1	3.051	0.007	0.328	0.600	10
RPS2	3.678	0.012	0.272	0.822	10
CYP1A1	2.881	0.137	0.347	0.289	10
CDKN1A	2.737	0.004	0.365	0.639	9
EDNRA	3.059	0.007	0.327	0.667	9
CYP3A4	3.737	0.053	0.268	0.194	9
ADRA1D	3.398	0.005	0.294	0.750	8

2.2 CHD 相关靶点数据构建及比对分析

在 CTD、OMIM、GeneCards 数据库共筛选出 94 403 个基因, 根据相关度每个数据库取前 300 个靶点组建 CHD 相关靶点数据库。对丹参酮 II_A 靶点与 CHD 相关发病机制靶点进行核查比对, 得出丹参酮 II_A 中与 CHD 相关发病机制的 42 个作用靶点基因, 包括 JUN、TP53、MYC、FOS、F2、CASP3 等。丹参酮 II_A 成分靶点与 CHD 相关发病机制靶点韦恩图, 见图 2。丹参酮 II_A 对 CHD 作用靶点的 PPI 网络关系, 见图 3。丹参酮 II_A 对 CHD 作用靶点的蛋白互作网络的拓扑学分析, 见表 2。经 Network

图 2 丹参酮 II_A 靶点与 CHD 相关发病机制靶点韦恩图Fig. 2 Venn diagram of tanshinone II_A target and CHD-related pathogenesis target

Analyzer 分析网络拓扑学属性发现, 该 PPI 网络中聚类系数为 0.457, 平均节点度为 7.82, 平均最短路径在 2.33~6.38, 介数中心性在 0~0.22 网络中节点的度值曲线、介数中心性曲线接近于幂律分布, 其中 42 个重叠靶点是该方与疾病作用的关键分子基础, 并在关系网络中体现了较好的连通特性。

2.3 丹参酮 II_A 对 CHD 作用靶点的生物信息学分析

经 David 数据库 GO 分析得出 51 个 BP, 包括药物反应、脂多糖的反应、凋亡过程的负调控等; 11 个 CC, 包括质膜外侧面、局灶性粘连、皱褶膜; 7 个 MF, 包括电子载流子活性、转录因子活性与序列特异性 DNA 结合、金属内切肽酶活性等, 经 Bonferroni 校正 P 值均 <0.05 , 见表 3。进一步被分为活性氧代谢产物、对氧含量的反应、平滑肌增殖的调节规律、对肌肉的反应、上皮细胞迁移的正向调节等, 见图 4。经 ClueGO 插件分析, 共分析出 49 条信号转导通路, 结果得到与心血管疾病相关度最高的 9 条相关通路, 其中包括肿瘤坏死因子 (TNF) 信号通路、Wnt 信号通路、cAMP 信号通路、PI3K-Akt 信号通路、缺氧诱导因子-1 (HIF-1) 信号通路、丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 信号通路、核转录因子- κ B (NF- κ B) 信号通路、Toll 样受体信号通路、FoxO 信号通路, 将得出的 49 条信号转导通路进一步再聚类分为 2 组, 分别为流体剪切应力与动脉粥样硬化、甾体激素生物合成, 见图 5。

2.4 丹参酮 II_A 成分-CHD 作用靶点分子对接结果分析

2.4.1 系统分子对接 (Systemsdock) 结果 丹参酮 II_A 对 CHD 作用靶点分子对接结果如表 4 所示。一般认为系统对接得分值大于 4.25 表示对接分子与靶点

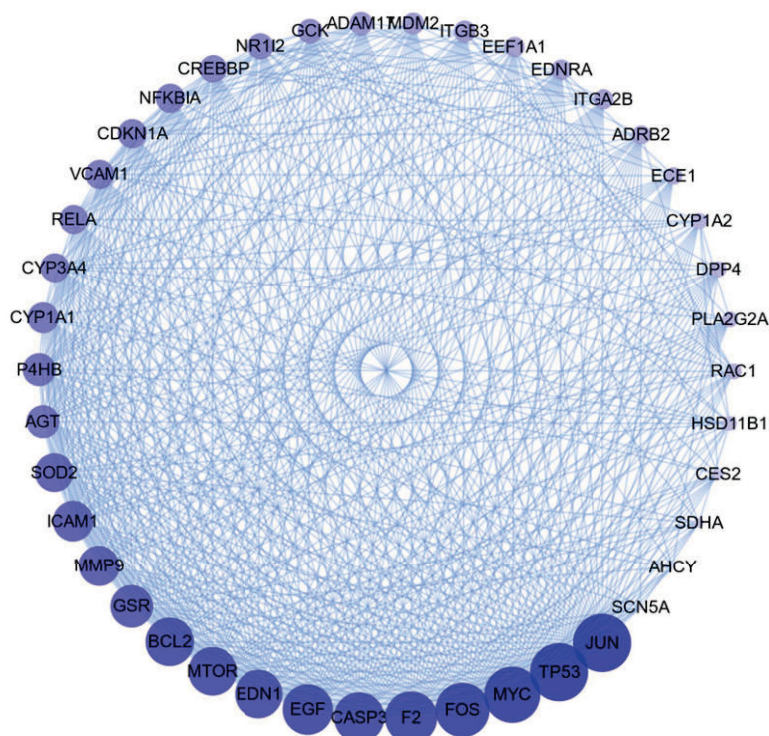


图 3 丹参酮 II_A 对 CHD 作用靶点的蛋白互作网络关系

Fig. 3 Protein interaction network of targets of tanshinone II_A on CHD

表 2 丹参酮 II_A 对 CHD 作用靶点的拓扑学分析

Table 2 Topological analysis of targets of tanshinone II_A on CHD

蛋白 名称	平均最 短路径	介数 中心性	中心 接近度	聚类 系数	度值	蛋白 名称	平均最 短路径	介数 中心性	中心 接近度	聚类 系数	度值
JUN	1.000	0.036	1.000	0.612	41	CYP3A4	1.366	0.008	0.732	0.754	26
TP53	1.000	0.036	1.000	0.612	41	CREBBP	1.390	0.003	0.719	0.867	25
MYC	1.024	0.032	0.976	0.624	40	NR1I2	1.415	0.005	0.707	0.783	24
FOS	1.049	0.026	0.953	0.650	39	GSK	1.439	0.007	0.695	0.755	23
F2	1.073	0.024	0.932	0.661	38	ADAM17	1.463	0.001	0.683	0.913	22
CASP3	1.098	0.019	0.911	0.685	37	ITGB3	1.488	0.002	0.672	0.900	21
EGF	1.098	0.018	0.911	0.689	37	MDM2	1.488	0.001	0.672	0.929	21
BCL2	1.122	0.018	0.891	0.692	36	ITGA2B	1.512	0.001	0.661	0.932	20
EDN1	1.122	0.019	0.891	0.690	36	EDNRA	1.512	0.002	0.661	0.868	20
MTOR	1.122	0.022	0.891	0.668	36	EEF1A1	1.512	0.003	0.661	0.837	20
GSR	1.195	0.017	0.837	0.686	33	ADRB2	1.537	0.003	0.651	0.830	19
MMP9	1.220	0.009	0.820	0.772	32	ECE1	1.561	0.001	0.641	0.928	18
ICAM1	1.220	0.010	0.820	0.754	32	CYP1A2	1.585	0.002	0.631	0.868	17
SOD2	1.244	0.013	0.804	0.725	31	RAC1	1.585	0.001	0.631	0.868	17
AGT	1.317	0.009	0.759	0.751	28	PLA2G2A	1.585	0.001	0.631	0.941	17
P4HB	1.317	0.011	0.759	0.722	28	DPP4	1.585	0.002	0.631	0.882	17
CYP1A1	1.341	0.005	0.745	0.818	27	HSD11B1	1.610	0.002	0.621	0.783	16
RELA	1.366	0.004	0.732	0.837	26	CES2	1.659	0.000	0.603	0.934	14
NFKBIA	1.366	0.003	0.732	0.874	26	SDHA	1.683	0.002	0.594	0.833	13
CDKN1A	1.366	0.003	0.732	0.865	26	AHCY	1.756	0.000	0.569	0.889	10
VCAM1	1.366	0.004	0.732	0.843	26	SCN5A	1.756	0.001	0.569	0.844	10

表 3 丹参酮 II_A 对 CHD 作用靶点的 GO 分析
Table 3 GO analysis of targets of tanshinone II_A on CHD

GO 分析编号	GO 分析分组	-lgP
GO:0042493	response to drug (BP)	9.954 677
GO:0032496	response to lipopolysaccharide (BP)	8.294 992
GO:0001666	response to hypoxia (BP)	8.132 533
GO:0035994	response to muscle stretch (BP)	7.263 603
GO:0071456	cellular response to hypoxia (BP)	6.943 095
GO:0043200	response to amino acid (BP)	6.037 631
GO:0043066	negative regulation of apoptotic process (BP)	5.928 118
GO:0070062	extracellular exosome (CC)	4.258 434
GO:0009897	external side of plasma membrane (CC)	3.955 746
GO:0005925	focal adhesion (CC)	3.650 503
GO:0032587	ruffle membrane (CC)	3.082 290
GO:0009986	cell surface (CC)	2.903 459
GO:0042470	melanosome (CC)	2.820 567
GO:0005783	endoplasmic reticulum (CC)	2.644 518
GO:0016604	nuclear body (CC)	2.602 969
GO:0005615	extracellular space (CC)	2.586 893
GO:0005789	endoplasmic reticulum membrane (CC)	2.546 242
GO:0005829	cytosol (CC)	2.387 707
GO:0016020	membrane (CC)	2.108 671
GO:0019899	enzyme binding (MF)	8.294 030
GO:0042802	identical protein binding (MF)	5.944 319
GO:0008134	transcription factor binding (MF)	5.311 521
GO:0031625	ubiquitin protein ligase binding (MF)	4.204 238
GO:0002020	protease binding (MF)	3.986 635
GO:0016491	oxidoreductase activity (MF)	3.929 404
GO:0005515	protein pinding (MF)	3.819 011
GO:0019825	oxygen binding (MF)	3.698 540
GO:0016712	oxidoreductase activity, acting on paired donors, with incorporation or reduction of molecular oxygen, reduced flavin or flavoprotein as one donor, and incorporation of one atom of oxygen (MF)	3.227 433

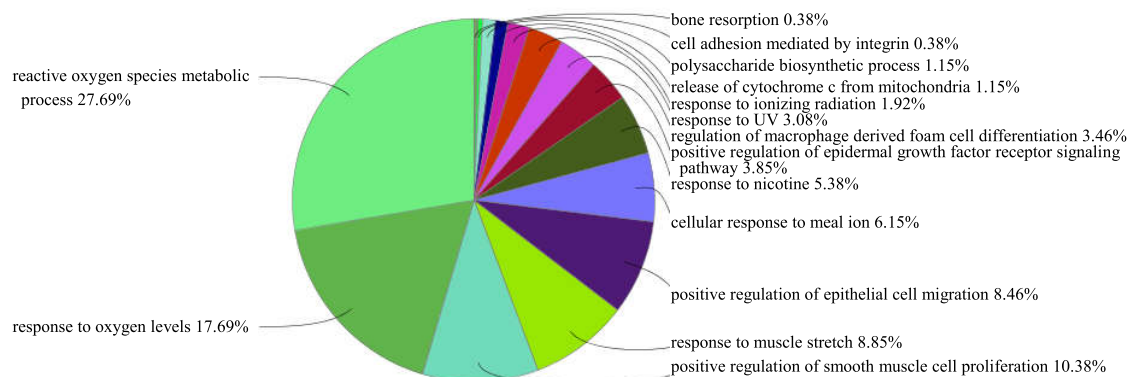


图 4 GO 分析功能注释饼状图

Fig. 4 Pie diagram of GO analysis function annotation

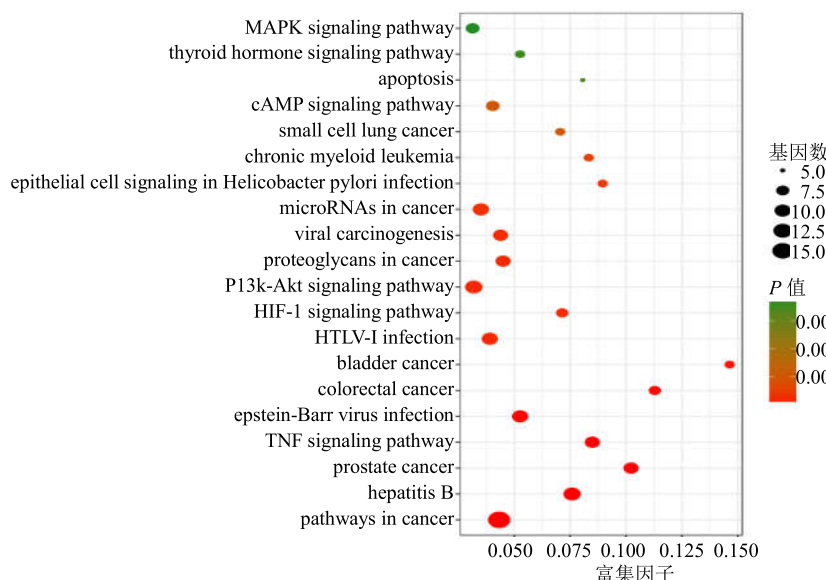


图 5 丹参酮 II_A 对 CHD 作用靶点的 KEGG 分析的气泡图 (前 20 条)

Fig. 5 Bubble map of KEGG analysis of targets of tanshinone II_A on CHD (Top 20)

表 4 丹参酮 II_A 对 CHD 作用靶点分子对接结果

Table 4 Target molecular docking results of tanshinone II_A on CHD

靶点名称	PDB 编号	系统对接得分	分子对接得分	靶点名称	PDB 编号	系统对接得分	分子对接得分
DPP4	4A5S	6.936	-87.271	CYP1A1	6DWM	6.461	-145.305
VCAM1	4N5X	6.874	-62.209	AHCY	5W49	6.455	-106.592
HSD11B1	2ILT	6.862	-97.980	MMP9	1GKC	6.406	-106.592
CYP3A4	4K9T	6.855	-108.605	CASP3	3GJQ	6.368	-91.310
BCL2	2VM6	6.837	-82.576	TP53	3DCY	6.244	-63.277
MTOR	4JSV	6.827	-77.151	SCN5A	4OVN	6.186	-73.865
MDM2	4JRG	6.811	-71.356	SOD2	3BFR	6.169	-75.140
GCK	4U3Y	6.785	-94.181	AGT	1XV5	6.148	-76.760
ITGB3	6BXB	6.783	-55.197	F2	5IMA	6.082	-69.363
CREBBP	4A9K	6.762	-76.738	CYP1A2	3WI2	6.024	-85.271
ECE1	3DWB	6.758	-75.631	SDHA	1NEK	5.876	-68.154
ITGA2B	3FCS	6.740	nan	RAC1	2P2L	5.856	-96.697
EDNRA	6BK6	6.706	-55.190	ADRB2	3D4S	5.248	-91.759
CES2	3K9B	6.648	-69.923	P4HB	3BJ5	5.056	-75.209
MYC	5YUN	6.619	-87.238	PLA2G2A	3U8B	4.616	-94.029
GSR	3DJG	6.597	-107.097	CDKN1A	3TS8	3.627	-84.289
ICAM1	5E6D	6.588	-74.700	NR1I2	1NRL	nan	-73.425
ADAM17	2DDF	6.570	-85.608	JUN	1JNM	nan	-65.199
EEF1A1	1IJE	6.521	-76.649	EDN1	1T7H	nan	-77.497
EGF	5KY5	6.518	-68.793	NFKBIA	2O61	nan	-84.367
RELA	3QXY	6.473	-105.009	FOS	6G4S	nan	nan

nan-无法结合

nan-unable to combine

之间有一定的结合活性, 大于 5.0 表明对接分子与靶点之间有较好的结合活性, 大于 7.0 则说明具有强烈的结合活性^[13]。分子对接结果显示丹参酮 II_A 与 MMP9、DPP4、SOD2、ITGB3、RAC1、NFKBIA、

VCAM1、ECE1、CYP3A4、GCK、MDM2 等 35 个靶点的系统对接得分值均大于 5.0, 由此表明丹参酮 II_A 与预测的 CHD 作用靶点有较好的结合活性。

2.4.2 iGEMDOCK 分子对接结果 将 CHD 的 42

个潜在靶点与丹参酮 II_A 进行分子对接, 由于 ITGA2B、FOS 的 PDB 结构没有原配体, 因此无法进行深入分析。配体与受体结合的构象稳定时能量越低, 发生的作用可能性越大。其中结合性最强的是 CYP1A1, 见图 6。

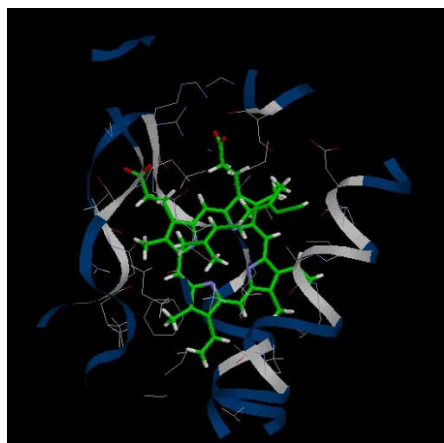


图 6 CYP1A1 与丹参酮 II_A 分子对接图

Fig. 6 Molecular docking diagram of CYP1A1 and tanshinone II_A

3 讨论

CHD 是冠状动脉血管发生冠状动脉粥样硬化病变或器质性狭窄、阻塞, 从而导致心肌缺血、缺氧或坏死而导致的心脏病。CHD 是高龄人群中最常见的心血管疾病, 是导致中老年患者死亡的首要疾病, 且其发生率和死亡率呈逐年上升趋势^[14]。目前西医治疗对 CHD 以二级预防和冠脉血运重建术为主, 且长期化学药治疗存在着耐受性差、耐药性强、不良反应重以及手术治疗经济负担重、手术禁忌证多、术后复发率高等问题^[15]。而经研究发现^[16], 中医药可以有效治疗 CHD 心绞痛, 改善预后, 降低病死率。在扩张冠脉、开放侧支循环、改善流变学及心功能, 保护心肌细胞、调节血脂、稳定斑块及保护血管内皮等方面具有明显的效果, 有着广阔的应用前景。丹参酮 II_A 为丹参酮中主要有效成分之一, 通过抑制钙调神经磷酸酶活性和钙调神经磷酸酶 mRNA 表达等途径抑制血管平滑肌细胞增殖, 起到扩张冠状动脉、增加冠脉血流量的作用并且可以保护缺血心肌, 防止钙超载, 减轻再灌注损伤^[17]。现代药理学研究表明, 丹参酮 II_A 可能通过抑制 IMA、Bax 蛋白升高及 H-FBAP、Bcl-2 蛋白降低对缺血再灌注损伤心肌组织和心律失常具有保护作用。临床上被证实联合其他药物可以明显改善患者的血脂、心功能及血流动力学, 且安全可靠, 未见

明显不良反应^[18]。

本研究通过筛选和文献挖掘寻找出丹参酮 II_A 173 个可能的靶点。在对丹参酮 II_A GO 分析的过程中发现血压调节相关的靶点包括 SDHA、CYP3A4、VCAM1、GSR、CYP1A1、HSD11B1、CYP1A2、SOD2。其中 CYP1A1 是芳烃受体 (AHR) 激活后产生的一种外源代谢酶, 但许多研究表明 CYP1A1 可以代谢内源多不饱和脂肪酸。Agbor 等^[19]在实验中发现, CYP1A1 有助于 *n*-3PUFA 依赖性主动脉 eNOS 激活、NO 依赖性、Ach 介导的肠系膜阻力小动脉扩张和 NO-血压的依赖性调节, 由生理性 AHR 信号 (CYP1A1 的主要转录调节因子) 转导产生的 CYP1A1 组成水平具有血管保护作用的功能。Guessous 等^[20]在研究中发现, 3 个 CYP1A2 变异的等位基因 (rs762551、rs1133323 和 rs1378942) 可以至少部分地驱动 15q24.1 位点来调节血压和高血压之间的关系。与活性氧代谢过程的正调控相关的靶点有 CDKN1A、AGT、F2、TP53; 与心脏发育相关的靶点有 EDNRA、ECE1、EDN1、SOD2; 与肌牵张反应相关的靶点有 EDNRA、ECE1、EDN1、SOD2。进一步被分为活性氧代谢产物、对氧含量的反应、平滑肌增殖的调节规律、对肌肉的反应、上皮细胞迁移的正向调节等。均与心肌细胞代谢、心电活动、血流灌注等显著相关, 该靶点及其机制均有大量实验研究论证支撑。进一步提示丹参酮 II_A 注射液治疗 CHD 可能与血压调节、细胞代谢、血管新生、内分泌、活性氧代谢等相关生物学过程有关。在丹参酮 II_A 对心血管疾病相关度最高的 9 条相关通路中, PI3K/Akt 信号通路是重要的细胞凋亡通路, Akt 可以抑制凋亡因子, 进而抑制细胞凋亡, PI3K/Akt 具有多种生物学作用, 除上述血管重塑和细胞自噬的生理功能外, 还可以调节代谢, 进而影响 CHD 的发生和发展^[21]。低氧诱导因子-1 α (HIF-1 α) 的心肌保护效应与诱导型一氧化氮合成酶 (iNOS) 增加可以减轻缺血再灌注损伤, 改善心功能, 在急性心肌缺血再灌注损伤兔模型上, PHD 抑制剂预处理可增加血红素加氧酶, 减少梗死面积, 提示血红素加氧酶作为 HIF-1 α 靶基因介导心脏保护作用^[22]。Sano 等^[23]在实验中发现心脏压力超负荷最初通过低氧诱导因子-1 (HIF-1) 依赖性诱导血管生成因子促进心脏血管生长, 抑制了 HIF-1 的活性, 可以损害心脏血管生成和收缩功能, 从而抑制血管生成阻止心脏肥大和诱导收缩功能障碍的发生。周

茜等^[24]通过实验发现促进 MAPK 的 ERK 的活化和减少促凋亡通路 JNK 和 p38 通路的激活,起到减轻心肌纤维化的药效,具有明显的心肌靶器官保护作用。罗永苗等^[25]通过研究发现 NF- κ B 是免疫炎症的重要转录因子,多种细胞因子和炎症介质可激活 NF- κ B 形成正反馈,结果导致最初的炎症信号进一步放大,促使动脉粥样硬化的发生。抑制 NF- κ B 活性,将会终止炎症介质的转录,最终限制免疫炎症反应,减少动脉粥样硬化的发生,延缓动脉粥样硬化的发展。吕宏娟等^[26]在实验中发现,抑制 Toll 样受体可以减轻血管紧张素 II 所致心脏纤维化,Toll 样受体参与血管紧张素 II 所致的高血压小鼠心肌纤维化过程。

系统分子对接和 iGEMDOCK 分子对接结果均显示,丹参酮 II_A 与丹参酮 II_A 对 CHD 作用靶点分子具有良好的结合活性,其中 iGEMDOCK 分子对接结果显示 CYP1A1 与丹参酮 II_A 有良好的结合性。说明丹参酮 II_A 可以与受体蛋白稳定结合并发挥作用。通过分子对接结果显示 CYP1A1、CYP3A4、CYP3A2 在对接结果中均显示良好的结合作用。研究表明^[27],部分 CYP 同工酶参与了丹参酮 II_A 的代谢,且丹参酮 II_A 在体外能强烈抑制 CYP1A2 的活性。丹参酮 II_A 能与 AHR 结合,而 AHR 作为一种配基激活转录因子,继而上调 CYP1A2 的表达能显著诱导 CYP 酶的活性以及基因、蛋白表达。分子对接的结果也进一步为丹参酮 II_A 治疗心肌梗死、心肌纤维化等心脏疾病提供了新的思路。

综上所述,本研究通过网络药理学技术,分析了丹参酮 II_A 在治疗 CHD 中的分子生物学机制,得出了丹参酮 II_A 治疗 CHD 可能的潜在靶点,为进一步理解药物有效成分-靶点-疾病相互作用机制提供重要信息,也为中医药治疗 CHD 方面提供了机制研究的思路。但是本研究仅基于网络药理学层面对丹参酮 II_A 治疗 CHD 进行了初探,但是由于网络信息技术尚不全面、数据库资料准确性及实时更新等方面有待提高等原因具有一定的局限性。此外丹参酮 II_A 可能通过药物中的小分子多肽、机体蛋白表达、调节肠道菌群等多种原因对 CHD 间接起到调控作用。因此对丹参酮 II_A 对 CHD 的间接作用的研究以及基础实验的验证或将成为下一步研究的重要内容。

参考文献

[1] 苏静,童远义,肖玉洪. 丹参酮 II_A 磺酸钠注射液联合曲美他嗪治疗冠心病的疗效及其对患者生活质量的

影响[J]. 海南医学, 2018, 29(17): 2383-2386.

- [2] 陈伟伟,高润霖,刘力生,等.《中国心血管病报告 2017》概要[J]. 中国循环杂志, 2018, 33(1): 1-8.
- [3] 乔高红. 丹参酮 II_A 磺酸钠注射液联合门冬胰岛素 30 注射液治疗糖尿病肾病的疗效观察[J]. 现代药物与临床, 2018, 33(9): 2403-2408.
- [4] 黄坤,陈伟伟,刘锐,等. 基于生物信息学方法分析复方苦参注射液治疗肝癌的分子生物学机制[J]. 山西医科大学学报, 2018, 49(9): 1013-1019.
- [5] 李泮霖,苏薇薇. 网络药理学在中药研究中的最新应用进展[J]. 中草药, 2016, 47(16): 2938-2942.
- [6] 杨倩,吕莉莉,孙蓉. 基于网络药理学的丹参川芎嗪注射液作用机制分析[J]. 中草药, 2018, 49(11): 2606-2613.
- [7] Zhang Y Q, Mao X, Guo Q Y, et al. Network pharmacology-based approaches capture essence of Chinese herbal medicines[J]. *Chin Herb Med*, 2016, 8(2): 107-116.
- [8] Liu X, Ouyang 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.
- [9] Wang X, Pan C, Gong J, 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.
- [10] Wang X, Shen Y, Wang S, 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.
- [11] 刘鑫馗,吴嘉瑞,张丹,等. 基于网络药理学的生脉散作用机制分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(16): 219-226.
- [12] 林昶,杨欣,朱璨,等. 新疆红花挥发油 GC-MS 分析及药理作用的分子机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(23): 104-111.
- [13] Hsin K Y, Ghosh S, Kitano H. Combining machine learning systems and multiple docking simulation packages to improve docking prediction reliability for network pharmacology[J]. *PLoS One*, 2013, 8(12): e83922.
- [14] 王冠男,李勇,张健,等. 美托洛尔联合胺碘酮治疗冠心病合并心律失常的临床疗效观察[J]. 中华老年心脑血管病杂志, 2018, 20(9): 932-935.
- [15] 胡黎文,余国辉,杜怡雯,等. 冠心病心绞痛的中医药治疗研究进展[J]. 湖南中医杂志, 2018, 34(5): 183-185.

- [16] 资 润. 中西医结合治疗慢性稳定型心绞痛的临床研究 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2008.
- [17] 王月鹏. 丹参酮II_A 磺酸钠联合氯吡格雷辅治不稳定型心绞痛临床疗效观察 [J]. 中医临床研究, 2015, 7(2): 97-98.
- [18] 何 薇, 石元龙, 郑成根. 丹参酮II_A 磺酸钠联合辛伐他汀治疗冠心病心绞痛的临床研究 [J]. 中国临床药理学杂志, 2016, 32(5): 393-395.
- [19] Agbor L N, Wiest E F, Rothe M, *et al.* Role of CYP1A1 in modulating the vascular and blood pressure benefits of omega-3 polyunsaturated fatty acids [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2014, 351(3): 688-698.
- [20] Guessous I, Dobrinas M, Kutalik Z, *et al.* Caffeine intake and CYP1A2 variants associated with high caffeine intake protect non-smokers from hypertension [J]. *Hum Mol Genet*, 2012, 21(14): 3283-3292.
- [21] 潘 晔, 殷 佳, 蔡雪朦, 等. 基于 PI3K/Akt 信号通路探讨中医药治疗冠心病的研究进展 [J]. 中草药, 2017, 48(19): 4100-4104.
- [22] 窦梦怡, 秦富忠, 李 保. 缺氧诱导因子在心脏重构和心力衰竭中的作用 [J]. 中国循环杂志, 2015, 30(11): 1125-1127.
- [23] Sano M, Minamino T, Toko H, *et al.* p53-induced inhibition of Hif-1 causes cardiac dysfunction during pressure overload [J]. *Nature*, 2007, 446(7134): 444-448.
- [24] 周 茜, 张敏芳, 任海燕, 等. 硫化氢干预对小鼠心肌纤维化 MAPK 通路表达的影响 [J]. 中国老年学杂志, 2018, 38(12): 2981-2984.
- [25] 罗永苗, 陈朝俊, 李玥珺. 基于 NF- κ B 探讨参七脉心通胶囊抗动脉粥样硬化的作用机制 [J]. 西部中医药, 2018, 31(5): 8-10.
- [26] 吕宏娟, 康晓敏. Toll 样受体 2 在血管紧张素II致高血压小鼠心肌纤维化中的作用 [J]. 中华老年心脑血管病杂志, 2014, 16(8): 860-862.
- [27] 和 凡, 钟国平, 赵立子, 等. 丹参酮II_A 对大鼠细胞色素 P450 酶的诱导作用 [J]. 中草药, 2009, 40(6): 938-942.