

基于斑马鱼模型和动态分子对接技术探讨 西洋参抗缺氧作用及潜在靶点

马智慧^{1,2}, 董榕², 赵焕新²,
刘慧茹^{1,2}, 丛媛青², 韩欣颖², 李正国^{1,3*}, 韩利文^{2*}

¹山东中医药大学药学院, 济南 250355; ²山东第一医科大学(山东省医学科学院)药学与制药科学学院, 济南 250000;

³山东省济宁市食品药品检验检测研究院, 济宁 272027

摘要:本研究利用斑马鱼模型和动态分子对接技术研究西洋参抗缺氧(hypoxia)的作用及潜在靶点。以AB系斑马鱼为实验动物,无水硫酸钠为造模剂诱导形成斑马鱼幼鱼缺氧模型,综合评价西洋参的抗缺氧作用。借助网络药理学技术筛选西洋参活性成分以及缺氧相关共有靶点;并使用STRING平台和Cytoscape 3.8.2软件构建蛋白-蛋白作用网络图,寻找西洋参抗缺氧可能的潜在靶点;利用动态分子对接技术验证活性成分与关键靶点的结合能力和稳定性。斑马鱼体内实验显示,西洋参提取物可明显增加斑马鱼在缺氧条件下的存活率,减轻因缺氧导致的神经行为状态($P < 0.05$),且呈剂量依赖性相关。共筛选获得西洋参7个潜在活性成分和5个抗缺氧潜在靶点;动态分子对接结果显示,西洋参关键活性成分与靶点之间有良好的结合能力,其中TNF、HSP90AA1与活性成分稳定结合,可能为西洋参抗缺氧的关键潜在靶点。综上,本实验建立的斑马鱼幼鱼抗缺氧模型可以快速简便地评价西洋参样品的抗缺氧活性,动态分子对接的结果显示该作用可能通过TNF以及HSP90AA1等靶点发挥作用,为后续西洋参抗缺氧机制研究提供了参考依据。

关键词:西洋参;缺氧;动态分子对接;斑马鱼;作用靶点

中图分类号:R285

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2023)4-0592-10

DOI:10.16333/j.1001-6880.2023.4.005

Exploring the anti-hypoxic effects and potential targets of American ginseng based on zebrafish model and dynamic molecular docking techniques

MA Zhi-hui^{1,2}, DONG Rong², ZHAO Huan-xin²,
LIU Hui-ru^{1,2}, CONG Yuan-qing², HAN Xin-ying, LI Zheng-guo^{1,3*}, HAN Li-wen^{2*}

¹Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China;

²School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Shandong First Medical University (Shandong Academy of Medical Sciences), Jinan 250000, China; ³Jining Food and Drug

Inspection and Testing Research Institute, Jining 272027, China

Abstract: This study investigated the anti-hypoxia effect and potential targets of American ginseng using zebrafish model and dynamic molecular docking technique. Zebrafish of the AB line were used as experimental animals, and anhydrous sodium sulfate was used as a modeling agent to induce hypoxia in juvenile zebrafish, and the anti-hypoxia effects of American ginseng were comprehensively evaluated. The active ingredients and hypoxia-related common targets of American ginseng were screened by the network pharmacology technique, and the protein-protein interaction network was constructed by STRING platform and Cytoscape 3.8.2 software to find the potential targets of the anti-hypoxia effect of American ginseng, and the binding ability and stability of the active ingredients to the key targets were verified by dynamic molecular docking technique.

In vivo experiments on zebrafish showed that the extract of American ginseng significantly increased the survival rate under

收稿日期:2022-12-05 接受日期:2023-02-15

基金项目:中央本级重大增减支项目(2060302-1907-09);山东第一医科大学学术提升计划(2019LJ003);山东省农业科技资金(园区产业提升工程)项目(2019YQ033)

*通信作者 Tel:86-531-59567223 E-mail:lzghw123@sina.com, hanliwen08@126.com

hypoxic conditions and reduced the neurobehavioral state caused by hypoxia ($P < 0.05$), and showed a dose-dependent correlation. Dynamic molecular docking results showed that total seven potential active compounds had good spontaneous binding ability with five potential anti-hypoxic targets, among which TNF, HSP90AA1 might be the key potential targets of American ginseng against hypoxia. In summary, The anti-hypoxia model of zebrafish larvae established in this experiment can quickly and easily evaluate the anti-hypoxia activity of American ginseng samples, and the results of dynamic molecular docking showed that the effect may work through TNF and HSP90AA1 targets, which provides a reference basis for the subsequent study of the anti-hypoxia mechanism of American ginseng.

Key words: American ginseng; hypoxia; dynamic molecular docking; zebrafish; target of action

缺氧(hypoxia)是一种由多种因素引起的复杂的病理过程,是指机体有不同程度的呼吸困难,通过呼吸道不能摄入过多足够的氧气,而导致机体发生病理变化,比如出现皮肤、手指、口唇等皮肤黏膜紫绀,甚至出现喘息、气促、胸闷等症状。缺氧可诱发心、脑、肺等多器官的不可逆损伤,进而可能发展为肺水肿或脑水肿等致命性疾病^[1]。传统中药在抗缺氧研究及临床应用具有明显的优势,如雪莲^[2]、手掌参^[3]等均已经证明具有较好的抗缺氧效果。深入挖掘祖国的特有药用植物资源,发现更多的高效低毒的药物,对于高原环境或病理引起的缺氧的防治仍具有重要意义。

目前用于抗缺氧疾病研究的模型主要为大鼠和小鼠模型,主要的方法有负重游泳实验^[4]、常压耐缺氧实验^[5]、亚硝酸钠中毒存活实验和急性脑缺血性缺氧实验^[6],在大规模药物筛选方面具有局限性且成本较高。研究发现,斑马鱼可以通过亚硫酸钠建立缺氧模型,而且斑马鱼产卵量高、实验周期短、成本低,可以实现高通量筛选^[7]。因此,我们采用模式动物斑马鱼探究西洋参的抗缺氧作用,并使用生物信息学的技术与方法,筛选和预测西洋参活性成分与潜在作用靶点,寻找西洋参抗缺氧作用的潜在靶点,为西洋参抗缺氧作用机制研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验动物

AB品系斑马鱼,由山东第一医科大学斑马鱼中心提供,于斑马鱼养殖专用系统饲养,饲养温度设定为26~28℃,养鱼水pH 6.8~7.5,每天给与14 h光照/10 h黑暗,丰年虫早晚各饲喂1次。实验所用幼鱼均由健康雌雄斑马鱼以2:2比例自然交配而得。

1.2 药品与试剂

西洋参购自山东文登,由山东第一医科大学韩利文副研究员鉴定为五加科人参属植物西洋参(*Panax quiquefolium* L.)干燥的根,样本被保存于山

东第一医科大学药学与制药科学学院标本室(批号:20211001);无水亚硫酸钠(批号20200708,质量分数≥99%)购自国药集团化学试剂有限公司;二甲基亚砜(DMSO,批号K1723046)购自上海Aladdin生化科技股份有限公司。

1.3 仪器

斑马鱼养殖系统(上海海圣生物实验设备有限公司);分析天平(GL2241-1SCN,赛多利斯);微型涡旋混悬仪(MINIVortex,北京东陵昌盛生物科技公司);索尼摄像机(DSC-RX100M7, Sony公司);底光板(30 cm×30 cm集成平板灯,电压100~240 V,河南雷迪航照明科技有限公司);溶氧仪(AR8210,希玛仪表)幼鱼行为记录分析软件Matlab 2019b(美国MathWorks公司)。

1.4 基于斑马鱼模型的西洋参抗缺氧作用研究

1.4.1 西洋参提取物的制备

将干燥至恒重的西洋参(American ginseng, AG)样本磨成粉末并过三号筛,取40 g置于圆底烧瓶中,按料液比1:10沸水浴回流提取两次,每次2 h,合并滤液,用旋转蒸发器浓缩至200 mL,逐渐缓慢加入4倍量的无水乙醇至醇浓度为80%,并不断搅拌,4℃静置24 h,离心取上清,用旋转蒸发器浓缩至一定的体积后放入真空干燥箱进行干燥,得到西洋参提取物,于4℃保存。

1.4.2 药液配制

精密称定无水亚硫酸钠,溶于纯水中,配制成质量浓度为0.15 g/mL的母液;精密称定西洋参提取物,溶于DMSO中,配制成质量浓度为10 mg/mL的溶液,于4℃保存备用,使用前稀释至所需浓度。

1.4.3 西洋参提取物耐受性考察

选用受精后5 d(days postfertilization, dpf)的AB系斑马鱼幼鱼,显微镜下筛选发育正常的幼鱼,每孔10条,每组平行3孔;设置加药组:西洋参提取物终质量浓度分别为50、100、150、200、250 μg/mL,同时设DMSO溶剂对照组(体积分数为0.5%)。加盖置

于恒温光照箱里孵育,每隔 24 h 更换药液,记录给药后 12、24、36、48 h 斑马鱼的存活情况。

1.4.4 斑马鱼缺氧模型的建立

根据参考文献的造模方法并给予优化调整^[8],向缺氧瓶中加入 335 μL 亚硫酸钠母液,降低水溶氧量,模拟缺氧环境,当水中溶氧量达到 0.6 mg/L 时,将斑马鱼幼鱼放入透明缺氧瓶中,斑马鱼幼鱼沉于水底、静止不动持续一定时间后,迅速将其捞出,进行下一步分析。

1.4.5 西洋参提取物对缺氧斑马鱼的存活时间影响

选用 5 dpf 斑马鱼放入 6 孔板中,每孔 30 条。西洋参处理组孔中加入西洋参提取物母液,使终浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$,常氧组与缺氧模型组不作处理,所有孔中加入养鱼水至 5 mL,然后将培养板置 28 $^{\circ}\text{C}$ 光照培养箱中孵育处理 48 h。期间每孔 24 h 换液 1 次。预保护处理结束后,所有组中斑马鱼移至透明缺氧瓶中(水中溶氧量为 0.6 mg/L),当幼鱼沉于水底、静止持续不动 1 min 后,记录其存活时间。

1.4.6 基于斑马鱼神经行为的西洋参抗缺氧实验

在缺氧环境下,斑马鱼会出现一些由神经障碍引起的行为变化^[9]。选取正常孵化受精后 5 d(days postfertilization, dpf) 的斑马鱼,在体式镜下观察后,将发育正常的健康幼鱼转移至 6 孔板中,设置常氧组(control, Con)、模型组(model, Mod)和西洋参给药组(AG 组),每组 30 条,其中西洋参提取物组的给药浓度分别为 50、100、150 $\mu\text{g}/\text{mL}$,空白组和模型组仅加入养鱼水,不做其他处理。各组预处理 48 h 后,移除原养鱼水,再加入 5 mL 1 mg/mL 造模剂无水亚硫酸钠,通过观察记录各组斑马鱼 10 min 内缺氧行为,统计每组出现浮头现象的数量。同时将空白组、模型组和西洋参提取物预处理过的斑马鱼幼鱼放入 24 孔板中,每组 12 孔,每孔 1 条,每孔加入 1 mL 1 mg/mL 亚硫酸钠溶液造模,通过摄像机拍摄斑马鱼幼鱼 30 min 的运动过程,运用 Matlab 及 margo 跟踪程序对其运动速度进行量化处理,计算统计各组幼鱼运动距离。

1.5 西洋参活性成分及缺氧相关靶点的获取

用中药系统药理学数据库与分析平台(TCM-SP)检索西洋参活性化学成分,以口服生物利用度(oral bioavailability, OB) $\geq 30\%$ 及药物相似性(drug-likeness, DL) ≥ 0.18 作为条件进行筛选,获得西洋参的活性成分,寻找符合条件的活性成分靶点

并用 UniProt 进行校正。另外通过文献挖掘与缺氧相关的西洋参活性成分^[10-15],通过化学结构数据库 PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) 查找其标准 SMILES 号,将其导入 Swiss TargetPrediction (<http://www.swisstargetprediction.ch/>) 预测靶点。以“Hypoxia”为关键词在 GeneCards (<https://www.genecards.org/>)、OMIM (<http://www.omim.org/>)、DisGeNET (<http://www.disgenet.org/>) 等疾病靶点相关的数据库中进行检索,其中以 GeneCards 数据库中 relevance score ≥ 1.0 , DisGeNET 数据库中 score_gda > 0.1 为筛选条件,获得与 Hypoxia 相关靶点。将筛选的西洋参活性成分靶点和缺氧相关靶点利用在线 Draw Venn Diagram (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>) 分析,获得关键交集靶点。

1.6 PPI 网络的构建及核心靶点的筛选

将关键靶点导入 STRING (<http://string-db.org/>) 数据库中,物种定义为“Homo sapiens”,对关键靶点进行蛋白-蛋白作用(protein-protein interaction, PPI) 网络分析,将得到的数据导入 Cytoscape 3.8.2,筛选度值(degree 值)前 5 位的靶点作为网络中的重要靶点。

1.7 关键靶点与西洋参有效成分的动态分子对接验证

将西洋参关键活性成分和 PPI 网络中度值前五的靶点进行整理筛选后,从小分子数据库 PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) 中分别下载关键活性成分的 2D 结构 Sdf 格式文件,运用 Chem 3D 进行小分子能量最小化并将化合物另存为 pdb 格式;从 RCSB 数据库 (<http://www.rcsb.org/>) 中下载靶点蛋白的 pdb 文件。对于目标蛋白,将文件导入到 PyMOL 对蛋白进行预处理,再采用 Autodock Vina 1.2.0 对七个关键成分和五个关键靶点进行分子对接模拟,验证这些关键靶点蛋白与化学有效成分的结合活性,通过 PyMOL 进行可视化处理,更进一步评价对网络分析结果。

以“1.7”项下对接结果选择为初始结构,选择核心靶点与化合物进行动力学模拟。以 Schrodinger 为动力学模拟软件,采用 Desmond 模块,使用 OPLS2005 立场,采用 TIP3P 水模型对蛋白-配体体系添加溶剂,添加钠离子平衡体系;采用正则系统(NVT)和等温等压系统(NPT)平衡体系,温度设置为 300 K,压力为 1.013 25 bar,其他参数采用默认

值,然后在常温常压下进行 50 ns 的分子动力学模拟,结果通过 PyMOL 和 GraphPad Prism8.0.1 软件进行可视化。

1.8 统计学分析

应用 SPSS 25.0 统计软件分析处理数据,应用 GraphPad Prism 8.0 软件进行作图分析,计量资料以平均值 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组均数比较使用单因素方差分析,两组均数比较采用成组 *t* 检验, $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 西洋参对缺氧斑马鱼的保护作用

由图 1A 可知,给药后 48 h 内,当给药质量浓度

高于 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,随着给药质量浓度的增大,幼鱼生存率(survival rate)显著降低;同时随着给药时间的延长,生存率也逐渐降低,因此我们在 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内给予西洋参。如图 1B 所示,所有维持在常氧条件下斑马鱼在整个实验期间都存活下来,而暴露于缺氧会在 4 ~ 10 min 之间的连续时间内死亡。暴露于缺氧环境中 7 min 时,缺氧组的存活率为(20 ± 2.01)%,而西洋参给药组存活率为(92 ± 2.70)% ($P < 0.001$),西洋参提取物预保护可明显增加斑马鱼的存活率(见图 1C、1D、1E),50、100、150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 西洋参提取物可明显减轻缺氧导致的斑马鱼行为($P < 0.05$),且呈剂量依赖性相关。图2

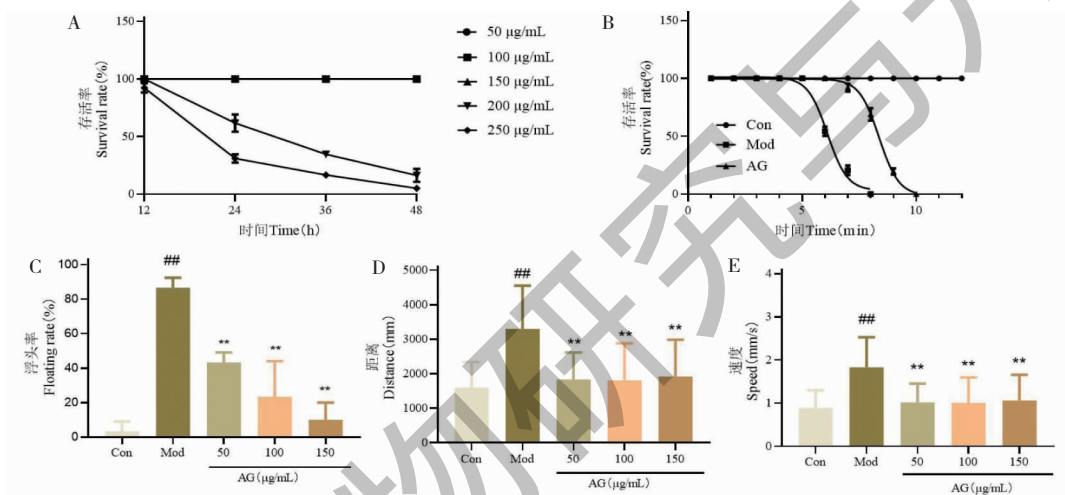


图 1 不同质量浓度的西洋参提取物对斑马鱼缺氧情况的影响($\bar{x} \pm s, n = 30$)

Fig. 1 Effect of American ginseng extracts with different mass concentrations on anoxia in zebrafish($\bar{x} \pm s, n = 30$)

注:与对照组比较,## $P < 0.01$;与模型组比较,** $P < 0.01$ 。Note:Compared with Con,## $P < 0.01$;Compared with Mod,** $P < 0.01$ 。

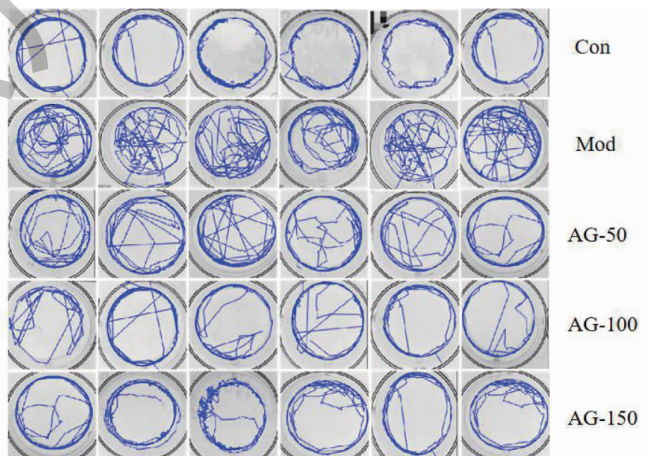


图 2 各组幼鱼缺氧后运动轨迹

Fig. 2 Movement trajectories of juveniles in each group after hypoxia

注:Con:常氧组;Mod:模型组;AG-50、AG-100、AG-150:分别为浓度 50、100、150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的西洋参给药组。Note:Con:normoxia group;Mod: Model hypoxia;AG-50,AG-100,AG-150:The concentrations are 50,100 and 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of American ginseng.

分析记录幼鱼缺氧后 3 min 内运动轨迹,缺氧后模型组幼鱼速度加快且四处无规则游动,而给药组随给药剂量增大运动轨迹越来越接近空白常氧组。

2.2 西洋参活性成分及缺氧相关靶点的获取

通过检索 TCMS 数据库和文献,共得到西洋参中 7 种活性成分(见表 1),利用 SwissTargetPrediction 数据库收集其可能的靶标,以可能性(probability)

>0 为筛选条件,得到活性成分靶标 121 个。根据 GeneCards、OMIM、DisGeNET 数据库检索缺氧相关的靶基因,经汇总删除重复项后,共得到 1935 个可能的靶点。利用韦恩图在线平台将 1935 个疾病靶点与 121 个西洋参活性成分作用靶点映射以绘制韦恩图,依据交集基因结果,获得可能的西洋参抗缺氧核心靶点 68 个(见图 3)。

表 1 西洋参活性成分信息
Table 1 Information of AG active components

序号 No.	活性成分 Active ingredient	化合物 ID Pubchem ID	相对分子质量 Relative molecular mass
1	罂粟碱 Papaverine	4680	339.4
2	人参皂苷 Ro Ginsenoside Ro	11815492	957.1
3	人参皂苷 Rb ₁ Ginsenoside Rb ₁	9898279	1 109.3
4	人参皂苷 Rb ₃ Ginsenoside Rb ₃	12912363	1 079.3
5	人参皂苷 Rg ₁ Ginsenoside Rg ₁	441923	801.0
6	人参皂苷 Rg ₃ Ginsenoside Rg ₃	9918693	785.0
7	拟人参皂苷 F ₁₁ Pseudoginsenoside F ₁₁	21633072	801.0

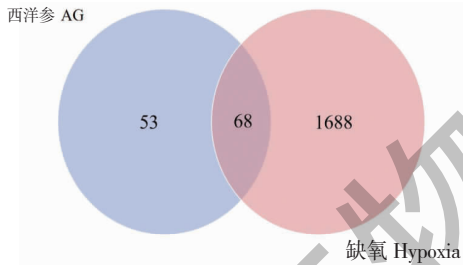


图 3 西洋参靶点与缺氧靶点交集韦恩图

Fig. 3 Venn of targets of American ginseng and hypoxia

2.3 关键靶点蛋白-蛋白相互作用分析

将西洋参活性成分靶点与缺氧交集靶点导入 STRING 数据库,分析 68 个关键靶点之间的相互作用关系并导出结果,导入结果到 Cytoscape 3.8.2 中获取 PP1 网络图,网络有 66 个节点,452 条边,degree 值越高,靶点在网络中的作用越好。通过 PPI 网络分析预测筛选出度值排名前五的核心靶点即 AKT1、TNF、JUN、STAT3、HSP90AA1(见图 4),这些可能为西洋参候选成分抗缺氧的关键靶点进行后续研究。

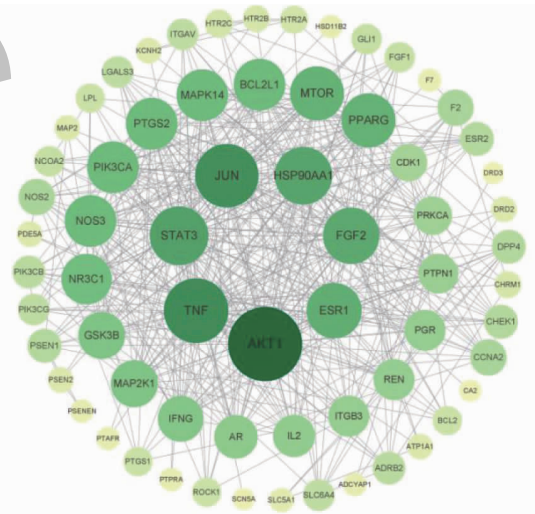


图 4 关键靶点蛋白互作网络图

Fig. 4 Key target protein interaction network diagram

2.4 活性成分与核心靶点分子对接

活性成分与核心靶点进行分子对接,结合能量热图及对接示意图分别见图 5、图 6,结果发现西洋

参活性成分拟人参皂苷 F_{11} 、罂粟碱、人参皂苷 Rg_3 、人参皂苷 Ro 、人参皂苷 Rg_1 、人参皂苷 Rb_1 、人参皂苷 Rb_3 与可能潜在靶点对接稳定。对接结果进一步

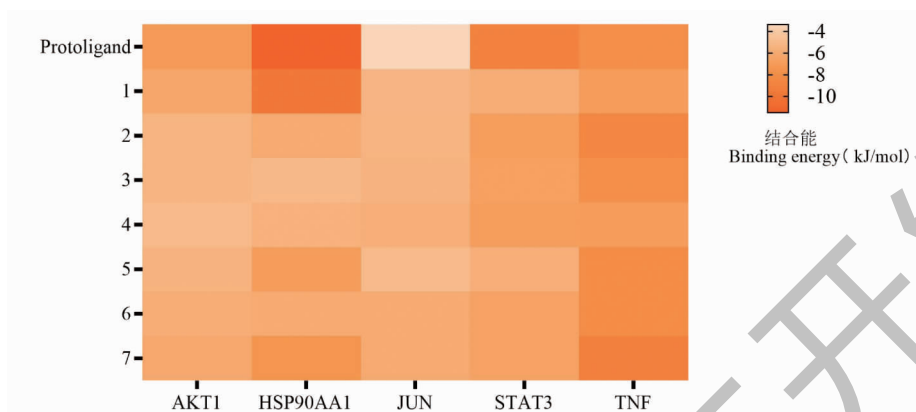


图 5 西洋参关键活性成分与靶点蛋白结合能量热图

Fig. 5 Heat map of binding energy between key active components of American ginseng and target proteins

注:Protoligand 为蛋白原配体;编号 1~7 对应表 1 中七种化合物。Note:Protoligand is original ligand;Number 1-7 corresponds to seven compounds in Table 1.

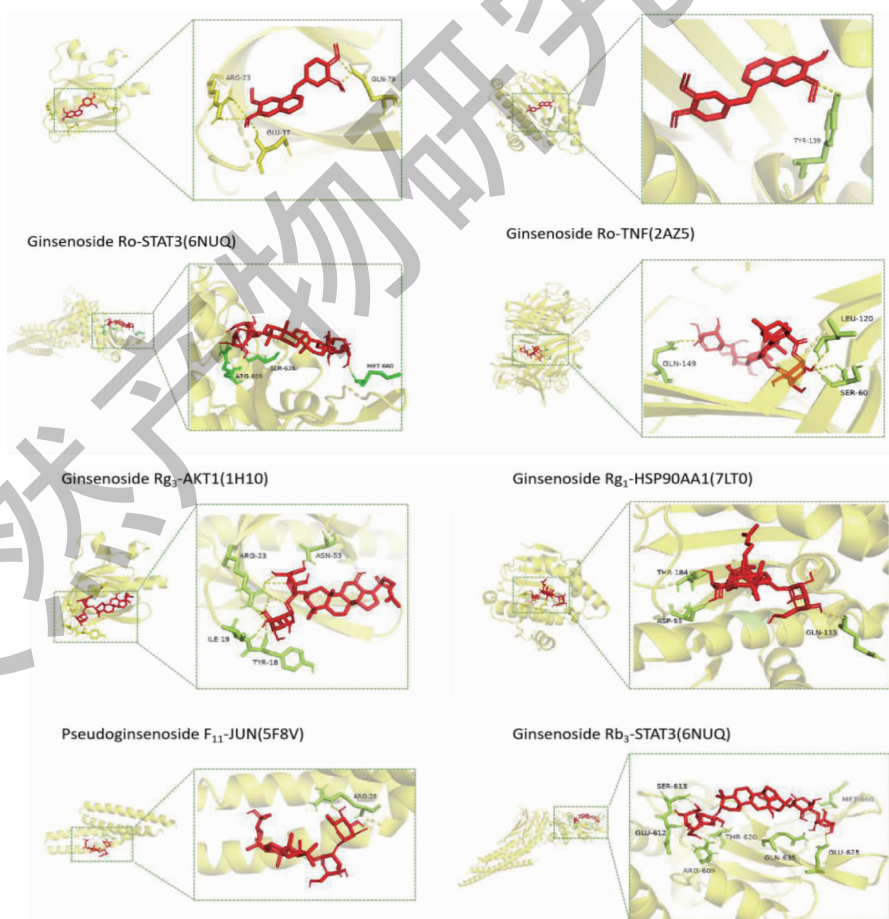


图 6 西洋参关键活性成分与缺氧核心靶点的分子对接示意图

Fig. 6 Schematic diagram of molecular docking between key active components of American ginseng and hypoxia core targets

分析发现,西洋参活性成分与 TNF 和 HSP90AA1 自发结合能力较好,与 JUN、STAT3 和 AKT1 有中等的结合能力,其中拟人参皂苷 F11、人参皂苷 Ro 与 TNF 结合相较于原配体有更低的结合能。

2.5 药物关键活性成分及疾病关键靶点的分子动力学模拟

进一步选择与关键靶点结合能力较好的活性成分进行分子动力学模拟,结果见图 7 所示,HSP90AA1-人参皂苷 Rg₁ 多体系分子动力学模拟时间 50 ns,均方根误差 (RMSD) 展示不同结构骨架原子间距离,其可以评估化合物与蛋白质配体结合后的稳定性。纵坐标表示蛋白质主链的 RMSD 值,通过 10 ns 动态模拟后,7LTO 蛋白的 RMSD 波动在

0.15 nm 附近收敛并达到平衡;表明蛋白在整个模拟过程中结构偏差小,较为稳定。均方根浮动 (RMSF) 可以观察氨基酸残基在活性位点附近波动的趋势,由图 6B 中可发现动力学模拟过程中所有的氨基酸残基的 RMSF 值都在 0.2 nm 以内,说明 HSP90AA1 与人参皂苷 Rg₁ 结合后比较稳定,整个体系波动较少。其中 93 号氨基酸残基 ASP 和 184 号残基 THR 与化合物形成较稳定的氢键,138 号氨基酸残基 PHE 和 51 号氨基酸残基 ASN 与化合物可形成稳定的水桥,而且所有氨基酸残基与化合物相互作用时间超过了整个模拟时长 30%,说明与 HSP90AA1 蛋白结合后,人参皂苷 Rg₁ 稳定了整个构象。

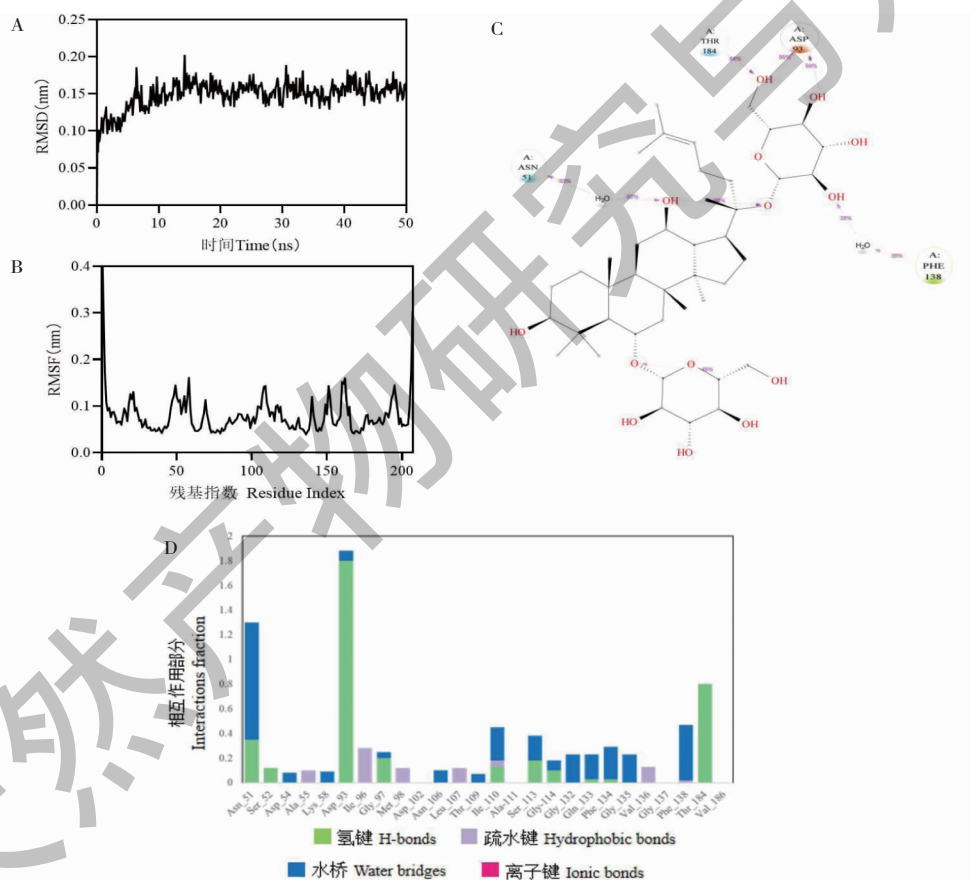


图 7 HSP90AA1-人参皂苷 Rg₁ 复合物体系的动力学模拟示意图

Fig. 7 Schematic diagram of kinetic simulation of HSP90AA1-ginsenoside Rg₁ complex system

如图 8A, TNF-人参皂苷 Ro 复合体系经过 8 ns 演化后, RMSD 波动在 0.13 nm 附近收敛并达到平衡; TNF 蛋白与人参皂苷 Ro 在整个模拟过程中结构偏差小, 较为稳定。大多数氨基酸残基的 RMSF 都在 0.2 nm 以内, 只有极少数氨基酸残基的 RMSF 值大于 0.2 nm, 说明人参皂苷 Ro 与 TNF 蛋白结合

后相对稳定, 整个体系波动较小。其中 11 号氨基酸残基 LYS 和化合物有相对较多的互作关系, 151 号氨基酸残基 TYR、121 号氨基酸残基 GLY、58 号氨基酸残基 ILE 与化合物形成较稳定的氢键, 59 号氨基酸残基 TYR、119 号氨基酸残基 TYR 与化合物通过疏水键紧密结合, 所有氨基酸残基与化合物相互

子-1 α (HIF-1 α)、环氧合酶-2(COX-2)和核因子 κ B(NF- κ B)的表达^[13];人参皂苷Rb₃可以稳定细胞膜,抑制NOS的表达和活性,对缺氧缺血性神经元损伤具有明显的保护作用^[21]。因此深入挖掘西洋参中的关键抗缺氧药效物质对于质量评价及新药研发具有重要意义。

PPI网络的拓扑分析结果提示AKT1、STAT3、HSP90AA1、JUN、TNF可能是西洋参抗缺氧的核心靶点基因。AKT1作为一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,可由PI3K与生长因子结合后活化,并以磷酸化作用激活或抑制下游一系列底物如凋亡相关蛋白Bad、Caspase 9、mTOR活性,从而参与调节细胞的增殖、分化、凋亡以及迁移等生物过程^[22]。研究发现,通过重组慢病毒介导Akt1基因转染可通过抑制凋亡显著提高大鼠BMSCs的缺氧耐受能力^[23]。STAT3是STAT家族成员,在调节细胞的增殖、分化、凋亡等过程中起关键作用。在缺氧诱导的肺动脉平滑肌细胞中,STAT3发挥着重要作用,阻断STAT3信号通路可有效抑制血管平滑肌细胞的增殖^[24]。HSP90AA1是热休克蛋白家族的一员,作为非应激细胞中最丰富的细胞质蛋白之一,在维持细胞稳态过程中起关键性作用,可在缺氧应激的条件下,提高细胞对外界应激的抵抗力^[24]。JUN属于原癌基因家族,是MAPKs超家族成员之一,可参与细胞的增殖、炎症、迁移和侵袭等过程,缺氧条件下磷酸化c-jun氨基末端激酶的表达水平提高可以促进大鼠肺动脉平滑肌细胞增殖^[25]。TNF是一种主要由单核细胞和巨噬细胞分泌的促炎细胞因子,它在广泛地调节炎症效应和宿主防御微生物病原体方面起着至关重要的作用^[26-28],缺氧应激时,TNF通过NF- κ B通路调节HIF-1 α (缺氧诱导因子-1 α)的转录水平^[29]。

本研究动态分子对接发现西洋参关键化合物(拟人参皂苷F₁₁、鞣栗碱、人参皂苷R₀、人参皂苷Rb₃、人参皂苷Rg₁、人参皂苷Rg₃)与缺氧核心靶点基因(AKT1、HSP90AA1、JUN、STAT3、TNF)可以很好结合。本分子对接研究确定晶体结构中原配体位置为活性对接口袋,保证了西洋参关键化合物与缺氧靶点蛋白结合位置为关键活性区域。结合能越低,配体与靶蛋白的结合能力越强,通过各化合物与靶点对接发现,促炎因子TNF与热休克蛋白HSP90AA1与关键活性成分结合能力较强,可能为西洋参抗缺氧潜在关键靶点。通过分子动力学对进

一步验证,发现HSP90AA1和人参皂苷Rg₁、TNF和人参皂苷R₀的动态模拟均能形成稳定构象,揭示和验证了该核心靶点和化合物复合物的结合紧密度与稳定性,为西洋参抗缺氧作用的潜在缺氧靶点研究提供可靠的理论依据。

综上,本研究通过斑马鱼模型评价西洋参抗缺氧作用,并利用网络药理学技术对参与抗缺氧的活性成分、核心靶点做了初步探索,借助分子对接技术和分子动力学对活性成分与核心靶点的结合进一步验证,揭示了西洋参抗缺氧可能潜在的靶点。由于中药成分的复杂性以及西洋参皂苷类成分分子结构等特点,以网络药理学为基础的初步探索仍显不足,针对预测结果中西洋参抗缺氧的作用靶点,后期将进一步给与实验验证,以期为西洋参抗缺氧的药效组分研究提供理论依据及参考,为后期相关机制研究提供依据。

参考文献

- Huang N,Zhao J. Pathophysiology(病理生理学)[M]. Beijing:Science Publishing House,2017:106-111.
- Zou B,Tian Y,Shi Z,et al. Protective effects of active compounds from on heart and brain of mice at simulated high altitude[J]. J Zhejiang Univ: Med Sci(浙江大学学报:医学版),2021,50:568-574.
- Liang CT,Liu L,Zhong Y,et al. Study on the anti-hypoxia mechanism of Tibet medicine *Gymnadenia conopsea* (L.) R. Br based on network pharmacology[J]. J Med Pharm Chin Minorities(中国民族医药杂志),2021,27:54-59.
- Liu LL. Study on the mechanism of the effect of aesculin on the learning and memory function of mice under and after hypoxia[D]. Jinzhou:Jinzhou Medical University(锦州医科大学),2020.
- Li Y,Han J,Chen Y,et al. p-Coumaric acid as a prophylactic measure against normobaric hypoxia induced pulmonary edema in mice[J]. Life Sci,2018,211:215-223.
- Kautza B,Gomez H,Escobar D,et al. Inhaled,nebulized sodium nitrite protects in murine and porcine experimental models of hemorrhagic shock and resuscitation by limiting mitochondrial injury[J]. Nitric Oxide,2015,51:7-18.
- Yue QF,Liu M,Fan XS,et al. Application of model organism zebrafish model in the study of prescription and medicine [J]. Mod Tradit Chin Med Mater Med World Sci Technol(世界科学技术-中医药现代化),2020,22:2173-2178.
- Marino KM,Silva ER,Windelborn JA. A comparison between chemical and gas hypoxia as models of global ischemia in ze-

- brafish (*Danio rerio*) [J]. *Animal Model Exp Med*, 2020, 3: 256-263.
- 9 Lee Y, Lee S, Park JW, et al. Hypoxia-induced neuroinflammation and learning-memory impairments in adult zebrafish are suppressed by glucosamine [J]. *Mol Neurobiol*, 2018, 55: 8738-8753.
- 10 Jiang Z, Wang Y, Zhang X, et al. Protective effect of ginsenoside Ro on anoxic and oxidative damage *in vitro* [J]. *Biomol Ther (Seoul)*, 2012, 20: 544-549.
- 11 Li YB, Wang Y, Tang JP, et al. Neuroprotective effects of ginsenoside Rg₁-induced neural stem cell transplantation on hypoxic-ischemic encephalopathy [J]. *Neural Regen Res*, 2015, 10: 753-759.
- 12 Liu D, Liu T, Teng Y, et al. Ginsenoside Rb₁ inhibits hypoxia-induced epithelial-mesenchymal transition in ovarian cancer cells by regulating microRNA-25 [J]. *Exp Ther Med*, 2017, 14: 2895-2902.
- 13 Chen QJ, Zhang MZ, Wang LX. Ginsenoside Rg₃ inhibits hypoxia-induced VEGF expression in human cancer cells [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2010, 26: 849-858.
- 14 Hou Y, Yang D, Wang X, et al. Pseudoginsenoside-F₁₁ promotes functional recovery after transient cerebral ischemia by regulating the microglia/macrophage polarization in rats [J]. *Int Immunopharmacol*, 2021, 99: 107896.
- 15 Sun J, Yu X, Huangpu H, et al. Ginsenoside Rb₃ protects cardiomyocytes against hypoxia/reoxygenation injury via activating the antioxidation signaling pathway of PERK/Nrf2/HMOX1 [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 109: 254-261.
- 16 Szczuka D, Nowak A, Zaklos-Szyda M, et al. American ginseng (*Panax quinquefolium* L.) as a source of bioactive phytochemicals with pro-health properties [J]. *Nutrients*, 2019, 11: 1041.
- 17 Ghosh R, Bryant DL, Farone AL. *Panax quinquefolius* (North American ginseng) polysaccharides as immunomodulators: current research status and future directions [J]. *Molecules*, 2020, 25: 5854.
- 18 Hu JN, Yang JY, Jiang S, et al. *Panax quinquefolium* saponins protect against cisplatin evoked intestinal injury via ROS-mediated multiple mechanisms [J]. *Phytomedicine*, 2021, 82: 153446.
- 19 Wu Y, Lu X, Xiang FL, et al. North American ginseng protects the heart from ischemia and reperfusion injury via up-regulation of endothelial nitric oxide synthase [J]. *Pharmacol Res*, 2011, 64: 195-202.
- 20 Xiao JM, Wang JJ, Sun LL. Effect of miR-134 against myocardial hypoxia/reoxygenation injury by directly targeting NOS3 and regulating PI3K/Akt pathway [J]. *Acta Cir Bras*, 2019, 34: e201900802.
- 21 Shen HM, Zhang ZJ, Jiang S. Protective effects of ginsenoside Rb₃ on hypoxic/ischemic brain injury and involved mechanisms [J]. *Chin J Appl Physiol (中国应用生理学杂志)*, 2006, 22: 302-306.
- 22 Yu JS, Cui W. Proliferation, survival and metabolism: the role of PI3K/AKT/mTOR signalling in pluripotency and cell fate determination [J]. *Development*, 2016, 143: 3050-3060.
- 23 Yu FX, Chen YE, Chen F, et al. Experimental study on the effect of Akt1 gene transfection on hypoxia tolerance of BMSCs [J]. *Chin J Reparat Reconstruct Surg (中国修复重建外科杂志)*, 2016, 30: 479-484.
- 24 Daniel JM, Dutzmann J, Bielenberg W, et al. Inhibition of STAT3 signaling prevents vascular smooth muscle cell proliferation and neointima formation [J]. *Basic Res Cardiol*, 2012, 107: 261.
- 25 Wu QJ, Zhang EL, Sun BD, et al. TLR9-JNK signal pathway regulates hypoxia induced proliferation of rat pulmonary artery smooth muscle cells [J]. *J Third Mil Med Univ (第三军医大学学报)*, 2021, 43: 2350-2357.
- 26 Josephs SF, Ichim TE, Prince SM, et al. Unleashing endogenous TNF-alpha as a cancer immunotherapeutic [J]. *J Transl Med*, 2018, 16: 242.
- 27 Cui YB, Chen SH, Liu Y, et al. Melatonin inhibits LPS-induced adipocyte inflammation and its mechanism [J]. *Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发)*, 2017, 29: 294-298.
- 28 Kaneko N, Kurata M, Yamamoto T, et al. The role of interleukin-1 in general pathology [J]. *Inflamm Regen*, 2019, 39: 12.
- 29 Malkov MI, Lee CT, Taylor CT. Regulation of the hypoxia-inducible factor (HIF) by pro-inflammatory cytokines [J]. *Cells*, 2021, 10: 2340.