

基于网络药理学及分子对接探讨桑叶-菊花治疗高血压的作用机制

郭锦晨^{1,2},王 茎^{2*},孙宇洁¹,冯 烨¹

¹安徽中医药大学研究生院,合肥 230012; ²安徽中医药大学新安医学教育部重点实验室,合肥 230038

摘要:本文旨在通过网络药理学和分子对接方法探讨桑叶-菊花治疗高血压的潜在分子作用机制。首先从 GEO 数据库下载基因芯片数据,使用 R 语言 limma 包筛选差异表达基因,通过中药系统药理学分析平台筛选桑叶-菊花有效成分及相应靶蛋白,利用 Venn 软件取药物与疾病交集靶点,运用 Cytoscape3.7.2 软件构建“化合物-靶点”网络及可视化分析,并用 Bisogenet 和 CytoNCA 插件对关键靶点进行蛋白网络互作及拓扑分析,通过 David 数据库和 R 语言 clusterProfiler 包对关键靶点进行 GO 功能富集及 KEGG 通路分析,应用 AutoDock Vina 软件对活性成分与关键靶点进行结果验证。结果显示桑叶-菊花成分作用于高血压的靶点 41 个,拓扑分析出 156 个核心靶点信息,GO 分析共包含 52 条生物过程、13 条分子功能、15 条细胞组成等 80 条富集结果,KEGG 通路分析发现 39 个条目,涉及 IL-17 信号通路、流体剪切应力与动脉粥样硬化信号通路、TNF 信号通路等。分子对接结果显示与关键靶点对接较好的成分有槲皮素、木犀草素。本研究初步揭示了桑叶-菊花通过“多成分-多靶点-多途径”协同作用发挥降压作用,为深入研究其物质基础及作用机制奠定了基础。

关键词:桑叶-菊花;高血压;网络药理学;分子对接;作用机制

中图分类号:R285

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2021)5-0847-12

DOI:10.16333/j.1001-6880.2021.5.017

Study on the mechanism of action of Folium Mori-Flos Chrysanthemi on hypertension based on network pharmacology and molecular docking

GUO Jin-chen^{1,2}, WANG Jing^{2*}, SUN Yu-jie¹, FENG Ye¹

¹Graduate School of Anhui University of Traditional Chinese medicine, Hefei 230012, China;

²Anhui University of Traditional Chinese Medicine Xin'an Key Laboratory of Medical Education, Hefei 230038, China

Abstract:This study aims to explore the potential molecular mechanism of Folium Mori-Flos Chrysanthemi (FM-FC) on the treatment of hypertension by network pharmacology and molecular docking methods. Firstly, the gene chip data was downloaded from GEO database, differentially expressed genes were screened with R language limma package, the effective components and corresponding target proteins of FM-FC were screened from Traditional Chinese Medicine System Pharmacology Database (TCMSP), the intersection targets of drugs and diseases were extracted with Venn software, the construction of "compound-target" network and visual analysis were completed by Cytoscape3.7.2 software, the protein network interaction and topology analysis of key targets were performed by Bisogenet and CytoNCA plug-ins. Then, David database and R language clusterProfiler package were used for GO function enrichment and KEGG pathway analysis of key targets. Finally, the results of active components and key targets were verified by AutoDock Vina software. The results showed that FM-FC acted on 41 targets of hypertension, 156 core target information was revealed by topological analysis. A total of 80 enrichment results including 52 biological processes, 13 molecular functions and 15 cell composition were obtained through GO analysis. KEGG pathway analysis found 39 items, involving IL-17 signal pathway, fluid shear stress and atherosclerosis signal pathway, TNF signal pathway, etc. The molecular docking results showed that quercetin and luteolin were components that docked well with key targets. We

have revealed preliminarily that FM-FC exerts a hypotensive effect through the synergistic effect of "multi-component-multi-target-multi-pathway" in this study, which will lay a foundation for further study of its material basis and mechanism of action.

Key words: Folium Mori-Flos Chrysanthemi; hypertension; network pharmacology; molecular docking; mechanism of action

高血压是一个由环境因素和遗传因素共同导致的多基因遗传性疾病,以体循环动脉血压升高为主要特征,可伴有心、脑、肾等器官的功能或器质性损害,是我国常见的心脑血管疾病之一,也是导致脑卒中、冠心病、心力衰竭的主要危险因素^[1]。随着我国居民生活水平的日益提高,高血压呈不断增高趋势,如治疗不及时,严重影响人类健康与生命。中医学将高血压病归属于“头痛”“眩晕”“风眩”等范畴,病因病机多因脏腑气血阴阳失调,风、火、痰、瘀、虚相兼为患,正虚为本,邪实为标,临幊上多呈虚实夹杂的致病特点。治疗上中药具有多效性、增效减副性、多靶点性、前瞻性等特点,能够保护高血压患者靶器官、减轻毒副作用、提高生活质量^[2],发挥着独特的优势作用。

桑叶(Folium Mori, FM)是桑科植物桑 *Morus alba* L. 的干燥叶,菊花(Flos Chrysanthemi, FC)为菊科植物菊 *Chrysanthemum morifolium* Ramat. 的干燥头状花序。两者甘寒体轻,均入肺、肝二经,临幊常协同为用,并走上焦疏风清热,同入下焦清热平肝、益阴明目,在《通俗伤寒论》羚角钩藤汤中二药为臣,平肝潜阳,清热息风,以助君药清热平肝之力。临幊两者配伍常可用于治疗风热感冒、肺热咳嗽、温病初起、肝阳上亢头痛眩晕、目赤肿痛、目暗昏花、疮痈肿毒等,现代医家常取桑叶-菊花药对平肝清肝之功用于高血压的治疗,能够较好缓解高血压所引起的头痛、眩晕、目赤肿痛等症状^[3],但桑叶-菊花降压的药效物质基础和作用机制尚不明确,研究报道亦较少。为此,本研究采用网络药理学及分子对接方法,分析桑叶-菊花治疗高血压的药效物质基础,探究其降压的潜在分子作用机制,以期为相关的基础实验研究及临床应用提供理论依据。

1 资料与方法

1.1 GEO 芯片数据的获取与处理

GEO 数据库(gene expression omnibus, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>)是美国国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information, NCBI)的基因表达综合库,以“hypertension/normal”为关键词,来源为“Homo sapiens”,从该数据库

下载 GSE75940 基因表达谱的原始数据,所选取芯片利用 R 语言 3.6.3 进行数据标准化。从中筛选高血压样本 4 例,正常样本 4 例。所有样本均采用 GPL13497 [Agilent-026652 Whole Human Genome Microarray 4x44K v2 (Probe Name version)] 平台检测,根据平台注释信息将探针转化为基因名。

1.2 差异基因的筛选

芯片进行处理和转化后,利用 R 语言 3.6.3 (<https://www.r-project.org/>) 中的 limma 包按照 $P\text{-value} < 0.05$, $|log2FC| > 0.5$ (FC 表示差异表达基因上调或下调倍数)的筛选条件筛选高血压和正常动脉血管平滑肌细胞的差异表达基因,负数代表下调、正数代表上调,对差异基因进行聚类分析,利用 R 语言 3.6.3 中的 pheatmap 包绘制火山图。

1.3 桑叶-菊花药物活性成分及作用靶点的筛选

通过检索中药系统药理学分析平台(Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology Database and Analysis Platform, TCMSP) (<http://lsp.nwsuaf.edu.cn/tcmsp.php>) 检索桑叶、菊花的化学成分,以口服生物利用度(oral bioavailability, OB) $\geq 30\%$ 和药物相似性(drug-like, DL) ≥ 0.18 作为筛选条件,时间截止至 2020 年 4 月 7 日,筛选出活性成分较高的化合物。

1.4 “化合物-靶点”的网络构建及可视化分析

从 DrugBank 数据库(<https://www.drugbank.ca/>)整合得到药物活性成分靶点,利用 Venn 在线软件(<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>)将药物与高血压差异表达基因相关靶点取交集,运用 Cytoscape3.7.2 (<http://www.cytoscape.org/>) 软件构建桑叶-菊花与高血压“化合物-靶点”网络并进行可视化分析。

1.5 蛋白网络互作构建及拓扑分析

利用 Cytoscape 3.7.2 软件中 Bisogenet 插件对桑叶-菊花与高血压关键靶点进行蛋白网络互作分析(protein-protein interaction, PPI),再用 CytoNCA 插件对网络中所有点的拓扑参数度中心性(degree centrality, DC)、接近中心性(closeness centrality, CC)和介度中心性(betweenness centrality, BC)进行

分析,借助网络拓扑理念筛选网络中的关键节点,筛选标准为 DC 大于所有节点 2 倍 DC 中位数,CC、BC 大于所有节点对应值的中位数。

1.6 GO 功能富集和 KEGG 通路分析

将关键靶点上传至 David 6.8 (Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery) 数据库(<https://david.ncifcrf.gov/>, Version 6.8),以人类为研究对象,进行基因功能(GO, gene ontology)分析以了解靶点主要的作用过程,主要包括生物过程(biological process, BP),细胞组成(cellular component, CC),分子功能(molecular function, MF)三方面。利用 R 语言 3.6.3 中的“clusterProfiler”包对关键靶点进行 KEGG(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes,<https://www.kegg.jp/>) 富集分析,并使用“ggplot2”包绘制气泡图,clusterProfiler 优势在于可以实时抓取 KEGG 最新版本注释得到更具时效性的富集注释结果。

1.7 分子对接验证

检索 RSCB PDB 数据库(<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>)并下载高血压靶蛋白的 3D 结构,检索并下载 TCMSP 数据库桑叶-菊花活性成分的 2D 结构,利用 Chem3D 进行结构优化。利用 PyMOL 2.4.0 软件对高血压靶蛋白进行除水、分离原配体等预处理。利用 AutoDock 的可视化软件

AutoDock Tools 1.5.6 软件设置 GridBox 各项参数,应用 AutoDock Vina 软件进行分子对接,最后运用 PyMOL、LigPlot + 软件对对接结果进行三维和二维可视化分析。

2 结果

2.1 高血压差异基因的筛选

基于 GEO 基因数据库 GSE75940 的基因片段原始数据,设置 $\log_2(\text{fold change})$ 的绝对值 >0.5 和 $P\text{-value} < 0.05$ 为筛选标准,总共得出 5 989 个高血压差异表达基因,其中包括 2 864 个下调基因和 3 125 个上调基因(见图 1);下调和上调最显著的 40 个基因见表 1。

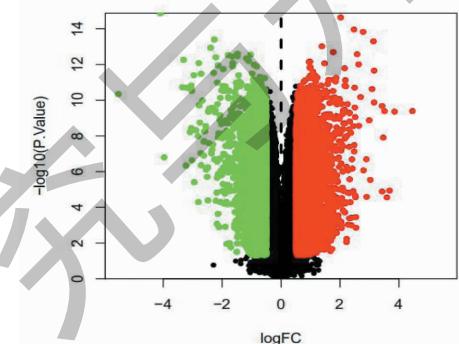


图 1 高血压差异表达基因的火山图

Fig. 1 Volcano map of differentially expressed genes in hypertension

表 1 高血压差异表达的上调下调基因

Table 1 Up-regulated and down-regulated genes differentially expressed in hypertension

上调基因 Upregulated gene	logFC	P-value	下调基因 Down-regulated gene	logFC	P-value
IGFBP5	4.456	4.06E-10	LOC728437	-5.525	4.58E-11
USP41	3.848	4.34E-10	SPANXN5	-4.095	1.33E-15
LOC100507012	3.679	1.15E-05	MGC12916	-3.968	1.61E-07
FAM75D1	3.591	2.79E-05	LOC100505679	-3.346	1.87E-11
FBXL21	3.508	4.11E-10	LOC91450	-3.311	5.46E-13
ANGPT2	3.466	1.24E-08	IL20	-3.223	4.59E-07
OR10H5	3.431	1.30E-05	ACTG2	-3.197	2.02E-11
SLC5A7	3.427	2.12E-10	GSDMC	-3.090	6.02E-09
LOC100134713	3.157	2.20E-12	C20orf106	-3.046	1.52E-11
MGC16703	3.154	1.33E-10	KIF5C	-3.044	3.74E-09
TFPI2	3.133	5.02E-14	C20orf107	-3.031	2.96E-11
SH2D2A	3.084	2.38E-11	UCP1	-3.023	2.31E-07
C17orf105	3.026	2.91E-06	MEP1B	-2.961	3.98E-12
FUT3	2.991	1.34E-09	GUCY2F	-2.947	3.92E-06

续表1(Continued Tab. 1)

上调基因 Upregulated gene	logFC	P-value	下调基因 Down-regulated gene	logFC	P-value
SCARNA22	2.902	2.59E-05	RAB39B	-2.886	4.79E-09
LINC00158	2.893	2.03E-07	FAM153B	-2.816	1.03E-08
SLCO5A1	2.796	8.48E-07	ACTRT1	-2.806	5.02E-05
LOXL4	2.784	1.49E-14	F2	-2.794	8.38E-13
DES	2.695	6.72E-11	DEFB103B	-2.784	1.95E-10
PZP	2.637	2.69E-09	VIL1	-2.754	1.81E-09

2.2 桑叶-菊花活性成分的筛选

在TCMSP中检索桑叶-菊花所有成分数数据,根据口服生物利用度OB和药物相似性DL,同时筛去

无对应靶点的成分,最终筛选出桑叶25个主要活性成分,菊花17个主要活性成分(见表2)。

表2 桑叶-菊花的有效活性成分
Table 2 Active components of FM-FC

化合物ID Mol ID	化合物名称 Molecule name	OB	DL	草药 Herb
MOL001771	Poriferast-5-en-3beta-ol	36.91	0.75	FM、FC
MOL000098	槲皮素 Quercetin	46.43	0.28	FM、FC
MOL000358	β-谷甾醇 Beta-sitosterol	36.91	0.75	FM、FC
MOL000422	山奈酚 Kaempferol	41.88	0.24	FM、FC
MOL002218	东莨菪碱 Scopolin	56.45	0.39	FM
MOL002773	β-胡萝卜素 Beta-carotene	37.18	0.58	FM
MOL003847	海棠果素 E Inophyllum E	38.81	0.85	FM
MOL003851	异热马酮 Isoramanone	39.97	0.51	FM
MOL003856	桑辛素 B Moracin B	55.85	0.23	FM
MOL003857	桑辛素 C Moracin C	82.13	0.29	FM
MOL003858	桑辛素 D Moracin D	60.93	0.38	FM
MOL003859	桑辛素 E Moracin E	56.08	0.38	FM
MOL003860	桑辛素 F Moracin F	53.81	0.23	FM
MOL003861	桑辛素 G Moracin G	75.78	0.42	FM
MOL003862	桑辛素 H Moracin H	74.35	0.51	FM
MOL003879	4-异戊烯基白藜芦醇 4-Prenylresveratrol	40.54	0.21	FM
MOL000433	FA	68.96	0.71	FM
MOL000729	氧化血根碱 Oxsanguinarine	46.97	0.87	FM
MOL000449	豆甾醇 Stigmasterol	43.83	0.76	FM
MOL001439	花生四烯酸 Arachidonic acid	45.57	0.20	FM
MOL003759	鸢尾黄酮甲素 Iristectorigenin A	63.36	0.34	FM
MOL006630	降桂木生黄素 Norartocarpitin	54.93	0.24	FM
MOL007179	亚麻酸乙酯 Linolenic acid ethyl ester	46.10	0.20	FM
MOL007879	四甲氧基木犀草素 Tetramethoxyluteolin	43.68	0.37	FM
MOL013083	茵芋苷(8CI) Skimmin (8CI)	38.35	0.32	FM

续表2(Continued Tab. 2)

化合物 ID Mol ID	化合物名称 Molecule name	OB	DL	草药 Herb
MOL011802	(24R)-马尾藻甾醇 (24R)-Saringosterol	39.36	0.79	FC
MOL011816	[(1S,5S,7S)-7-乙酰氧基-5-异丙烯基-2,8-二甲基-环癸基]乙酸酯 [(1S,5S,7S)-7-acetoxy-5-isopropenyl-2,8-dimethylene-cyclodecyl] acetate	37.02	0.19	FC
MOL001689	金合欢素 Acacetin	34.97	0.24	FC
MOL003044	黄酚 Chryseriol	35.85	0.27	FC
MOL000354	异鼠李素 Isorhamnetin	49.6	0.31	FC
MOL005100	5,7-二羟基-2-(3-羟基-4-甲氧基苯)苯并二氢吡喃-4-酮 5,7-Dihydroxy-2-(3-hydroxy-4-methoxyphenyl) chroman-4-one	47.74	0.27	FC
MOL000006	木犀草素 Luteolin	36.16	0.25	FC
MOL001733	半齿泽兰素 Eupatorin	30.23	0.37	FC
MOL001755	24-乙基胆甾-4-烯-3-酮 24-Ethylcholest-4-en-3-one	36.08	0.76	FC
MOL002881	香叶木素 Diosmetin	31.14	0.27	FC
MOL004328	柚皮素 Naringenin	59.29	0.21	FC
MOL005229	艾黄素 Artemetin	49.55	0.48	FC
MOL011319	块菌 OBP Truflex OBP	43.74	0.24	FC

2.3 “化合物-靶点”的网络构建及可视化分析

将 DrugBank 数据库得到的所有靶点,删除重复并去除假阳性,整合得到桑叶、菊花活性成分作用靶点 241 个,与高血压差异表达基因相关靶点取交集得到基因靶点 41 个,涉及桑叶-菊花活性成分 29

个,通过 Cytoscape 3.7.2 软件构建桑叶-菊花与高血压“化合物-靶点”的可视化网络图(见图 2),主要活性成分有槲皮素、山奈酚、 β -胡萝卜素、花生四烯酸、金合欢素、木犀草素等,关键基因有 JUN、MMP9、PTGS2、EGFR、CCND1、MMPI、SPP1 等。

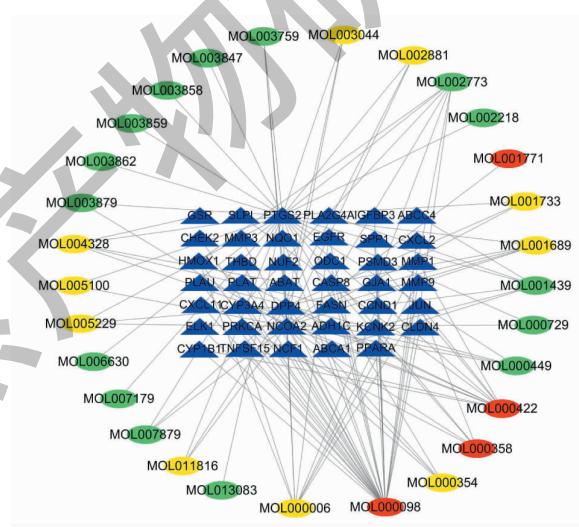


图2 桑叶-菊花与高血压“化合物-靶点”的可视化网络图

Fig. 2 Visualized network diagram of "compound-target" between FM-FC and hypertension

注：蓝色三角形节点代表作用靶点，椭圆形节点代表有效成分化合物（绿色为桑叶；黄色为菊花；红色为桑叶-菊花）。Note: The blue triangle node represents the action target, and the oval node represents the active ingredient compound (green is FM; yellow is FC; red is FM-FC).

2.4 蛋白网络互作构建及拓扑分析

利用 Cytoscape 3.7.2 软件中 Bisogenet 插件对 41 个关键靶点进行蛋白网络互作分析, 得到由 2303 个节点和 45 586 个边组成的网络, 与高血压上

下调表达最显著的差异表达基因交集的有 IGFBP5、KIF5C、SH2D2A、MEP1B、F2、PZP。再用 CytoNCA 插件对网络中所有点的拓扑参数(DC、CC 和 BC)进行分析,选择靶点 DC 值大于中位数 2 倍作为筛选

核心靶点的条件,初步得到 619 个节点和 20 405 个边组成的网络,二次筛选以 CC 值 >0.518 得到 310 个节点和 9 983 个边组成的网络,最后 BC 值 >147 进一步筛选,构建了 1 个具有 156 个节点和 3 808

条边的桑叶-菊花与高血压的靶点网络(见图 3)。拓扑分析出 156 个核心靶点信息,根据 DC >185 列举出前 50 个见表 3。

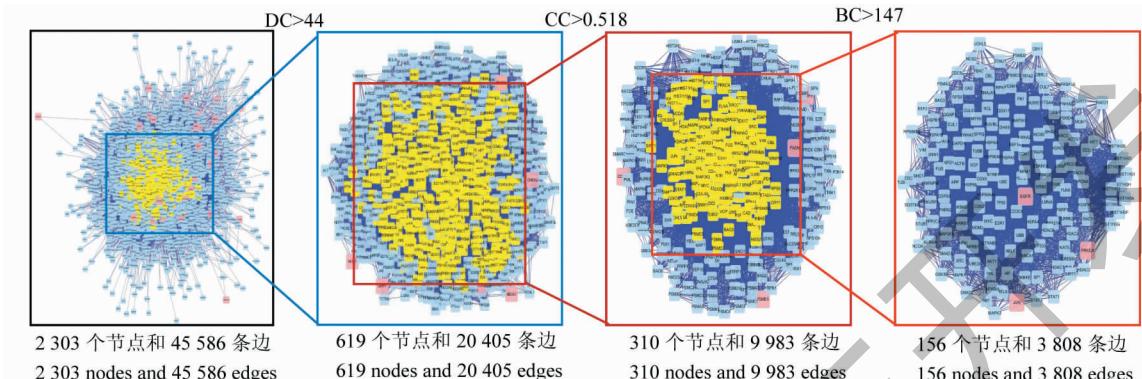


图 3 蛋白网络互作构建及拓扑分析

Fig. 3 Interaction construction and topological analysis of protein networks

表 3 拓扑分析 156 个核心靶点信息 (DC >185)

Table 3 Topological analysis of 156 core target information (DC >185)

基因 Gene	DC	CC	BC	基因 Gene	DC	CC	BC
EGFR	933	0.636	1 559	CCDC8	237	0.566	599
NTRK1	693	0.660	2 387	CUL1	236	0.581	866
APP	401	0.572	704	TRAF6	228	0.566	648
CUL3	380	0.614	1 329	SRC	224	0.555	313
TP53	375	0.620	1 635	SIRT7	221	0.557	344
UBC	358	0.609	1 229	CDC5L	217	0.556	416
MCM2	346	0.609	1 348	HSPA8	216	0.582	796
HSP90AA1	331	0.602	1 183	BRCA1	216	0.571	683
FN1	321	0.597	977	VCAM1	215	0.573	666
ESR1	320	0.595	1 054	HSPA5	214	0.581	945
XPO1	313	0.561	490	OBSL1	212	0.563	457
GRB2	299	0.577	561	HDAC1	210	0.557	393
CDK2	284	0.589	938	PARK2	209	0.567	705
JUN	273	0.548	256	UBE2I	204	0.553	347
PRKCA	271	0.540	176	SNW1	203	0.555	337
MYC	270	0.567	848	MDM2	200	0.562	516
VCP	264	0.576	735	CREBBP	197	0.558	358
HSP90AB1	263	0.583	753	EWSR1	196	0.553	311
YWHAZ	261	0.589	978	HUWE1	195	0.570	664
EP300	259	0.580	713	YWHAQ	193	0.562	505
CUL7	258	0.581	708	AKT1	193	0.553	388
NPM1	250	0.582	1 088	CTNNB1	189	0.557	394

续表 3(Continued Tab. 3)

基因 Gene	DC	CC	BC	基因 Gene	DC	CC	BC
FBXO6	246	0.561	459	HDAC5	188	0.565	714
COPS5	241	0.578	786	EEF1A1	187	0.566	588
ITGA4	238	0.582	896	AR	187	0.552	324

2.5 GO 功能富集分析

利用 DAVID 平台进行 GO 功能富集分析,包括生物过程(BP)、细胞组分(CC)和分子功能(MF)3个分支,设定阈值 $P < 0.05$,对筛选得到的 41 个关键靶点进行分析(见图 4),这些靶点主要涉及对脂多糖的反应(response to lipopolysaccharide)、对平滑肌细胞增殖的正向调节(positive regulation of smooth muscle cell proliferation)、缺氧反应(response to hy-

poxia) 等 52 条生物过程。CC 分析可以看出靶点主要涉及细胞外空间 (extracellular space)、内质网膜 (endoplasmic reticulum membrane)、细胞膜筏 (membrane raft) 等 15 条细胞组分。MF 分析中可以看出，靶点主要涉及酶结合 (enzyme binding)、丝氨酸内肽酶活性 (serine-type endopeptidase activity)、蛋白质均聚活性 (protein homodimerization activity) 等 13 条分子功能。

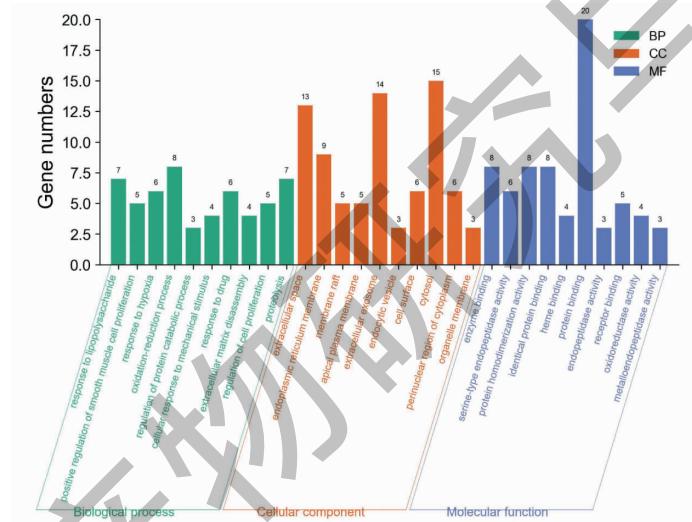


图4 桑叶-菊花活性成分治疗高血压靶点的GO富集分析

Fig. 4 GO Enrichment analysis of active components from FM-FC in treating hypertension

2.6 KEGG 通路富集分析

使用 clusterprofiler R 包对 41 个关键基因进行 KEGG 通路分析, 设定阈值为 $P < 0.05$, 得到的 39 条 KEGG 通路富集, 并绘制气泡图和通路-关键基因关系网络, 结合表 4 和图 5、图 6, 可知基因主要集中在 IL-17 信号通路 (IL-17 signaling pathway)、流体剪切应力与动脉粥样硬化信号通路 (Fluid shear stress and atherosclerosis)、催产素信号通路 (Oxytocin signaling pathway)、TNF 信号通路 (TNF signaling pathway) 等通路上, 主要基因有 JUN、PTGS2、MMP9、PRKCA、CCND1、EGFR、CASP8、ELK1 等。

2.7 分子对接分析

将槲皮素、山奈酚、 β -胡萝卜素、花生四烯酸、金

合欢素、木犀草素等桑叶-菊花的主要活性成分与 JUN、PTGS2、MMP9、MMP1、CCND1 等高血压核心靶点进行逐一对接,结合能小于 0 提示配体与受体可自发结合,且结合构象越稳定,所需结合能越低,≤-4.25 kcal/mol 说明有一定结合活性,≤-5.0 kcal/mol 说明有较好结合活性,≤-7.0 kcal/mol 说明有强的结合活性(见图 7)。本研究选取结合能 < -9.0 kcal/mol 作为筛选条件(见表 5),同时运用 PyMOL 和 LigPlot + 软件将结合能前 5 位的对接结果制作 2D 和 3D 对接示意图。综合分析,槲皮素、木犀草素可能是桑叶-菊花降压的关键活性成分。

3 讨论

高血压是脑卒中及冠心病发病的首要危险因

素,是全球导致死亡的最重要因素之一,中医病因病机复杂,病机多见阴虚阳亢动风、痰湿瘀血阻滞等,病位多责之于肝、肾、脾,现代医学认为其发病受多

个环节、多种机制(RAAS、氧化应激、炎症、神经-免疫因素、非编码RNA)和多种因素相互影响^[4]。桑叶“乃箕星之精,箕好风,故善搜风”(《成方便

表4 KEGG通路富集分析(前20条)

Table 4 Enrichment analysis of KEGG pathway (top 20)

ID	通路 Pathway	基因 Gene
hsa04657	IL-17 signaling pathway	PTGS2/CASP8/JUN/MMP1/MMP3/MMP9/CXCL2
hsa05418	Fluid shear stress and atherosclerosis	NCF1/JUN/HMOX1/MMP9/PLAT/THBD/NQO1
hsa05215	Prostate cancer	MMP3/EGFR/CCND1/PLAU/MMP9/PLAT
hsa04921	Oxytocin signaling pathway	PTGS2/JUN/EGFR/CCND1/ELK1/PRKCA/PLA2G4A
hsa04668	TNF signaling pathway	PTGS2/CASP8/JUN/MMP3/MMP9/CXCL2
hsa05219	Bladder cancer	MMP1/EGFR/CCND1/MMP9
hsa04912	GnRH signaling pathway	JUN/EGFR/ELK1/PRKCA/PLA2G4A
hsa05206	MicroRNAs in cancer	PTGS2/HMOX1/CYP1B1/EGFR/CCND1/PLAU/MMP9/PRKCA
hsa05225	Hepatocellular carcinoma	HMOX1/EGFR/CCND1/ELK1/PRKCA/NQO1
hsa04510	Focal adhesion	JUN/EGFR/CCND1/ELK1/PRKCA/SPP1
hsa04926	Relaxin signaling pathway	JUN/MMP1/EGFR/MMP9/PRKCA
hsa04115	p53 signaling pathway	CASP8/CCND1/CHEK2/IGFBP3
hsa05205	Proteoglycans in cancer	EGFR/CCND1/PLAU/MMP9/ELK1/PRKCA
hsa05140	Leishmaniasis	PTGS2/NCF1/JUN/ELK1
hsa05204	Chemical carcinogenesis	PTGS2/CYP3A4/CYP1B1/ADH1C
hsa05163	Human cytomegalovirus infection	PTGS2/CASP8/EGFR/CCND1/ELK1/PRKCA
hsa04012	ErbB signaling pathway	JUN/EGFR/ELK1/PRKCA
hsa05160	Hepatitis C	CASP8/EGFR/CCND1/CLDN4/PPARA
hsa05323	Rheumatoid arthritis	JUN/MMP1/MMP3/CXCL2
hsa05161	Hepatitis B	CASP8/JUN/MMP9/ELK1/PRKCA

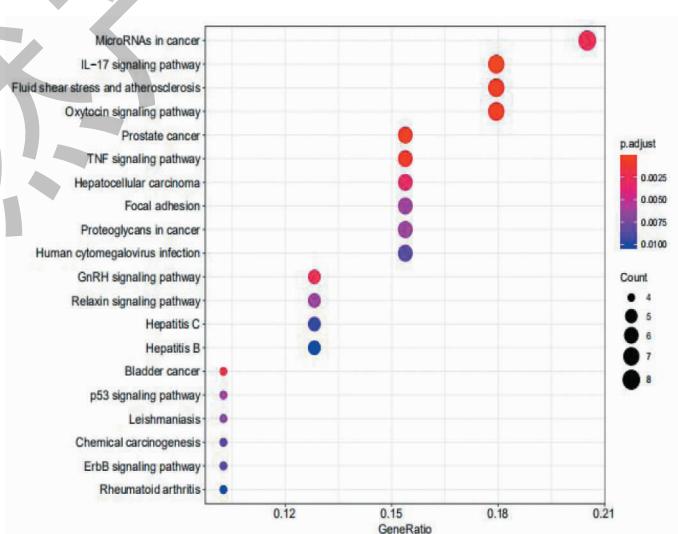


图5 KEGG通路富集分析气泡图(前20条)

Fig. 5 Bubble diagram of KEGG pathway enrichment analysis (top 20)

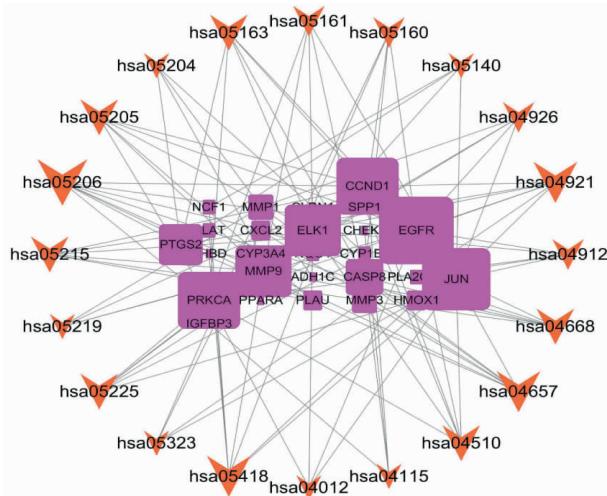


图 6 KEGG 通路-关键基因关系网络

Fig. 6 KEGG pathway-key gene relationship network

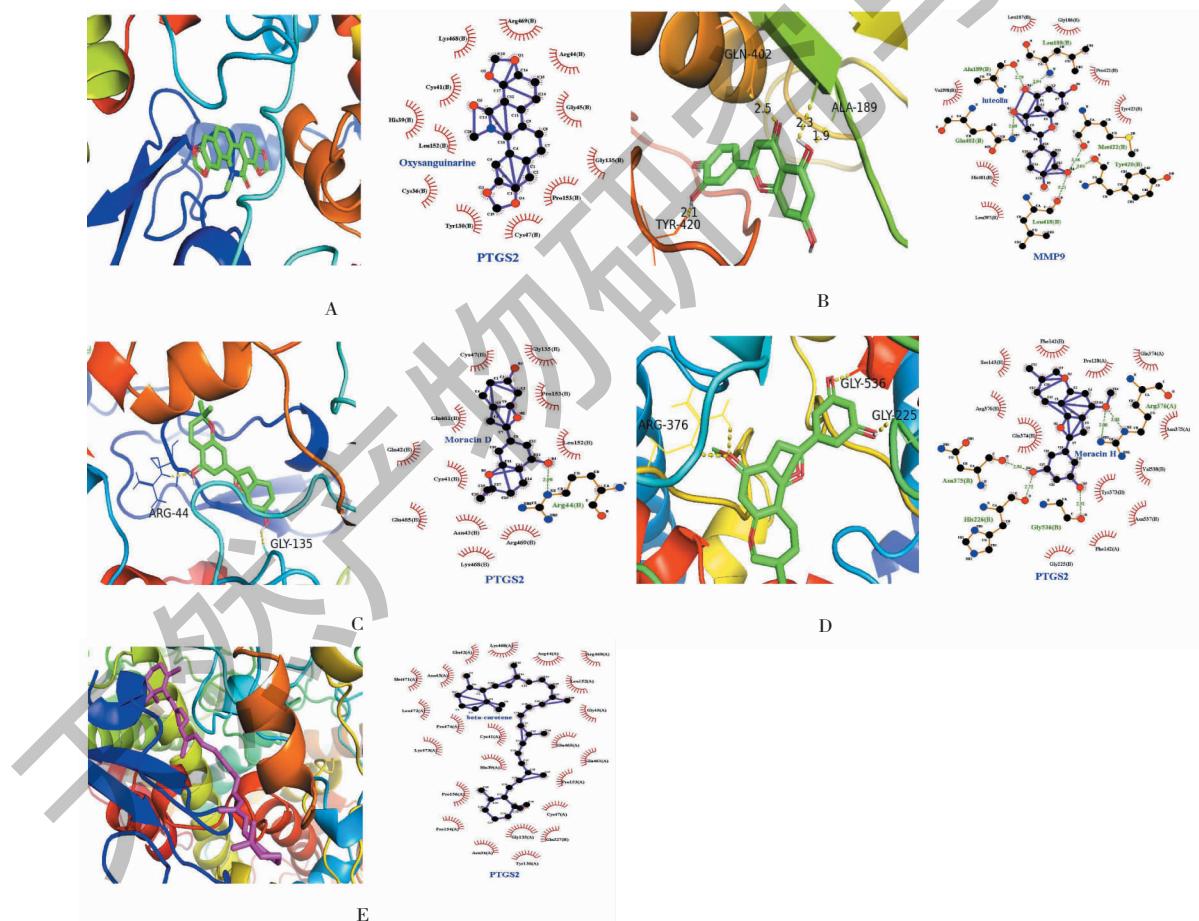


图 7 桑叶-菊花活性成分与靶蛋白对接二维及三维图(结合能≤9.8 kcal/mol)

Fig. 7 Two-dimensional and three-dimensional maps of docking between active components

of FM-FC and target protein (binding energy ≤9.8 kcal/mol)

注:A~E 分别为氧化血根碱与 PTGS2、木犀草素与 MMP9、桑辛素 D 与 PTGS2、桑辛素 H 与 PTGS2、 β -胡萝卜素与 PTGS2 的分子对接图。

Note: A-E are molecular docking diagrams of sanguinarine oxide and PTGS2, luteolin and MMP9, moracin D and PTGS2, moracin H and PTGS2, and

 β -carotene and PTGS2, respectively.

表 5 桑叶-菊花活性成分与靶点的结合能
Table 5 Binding energy of active components of FM-FC to targets

靶点 Target	活性成分 Active ingredient	结合能 Binding energy (kcal/mol)	靶点 Target	活性成分 Active ingredient	结合能 Binding energy (kcal/mol)
PTGS2	氧化血根碱 Oxsanguinarine	-11.9	MMP1	槲皮素 Quercetin	-9.4
MMP9	木犀草素 Luteolin	-10.5	PTGS2	金合欢素 Acacetin	-9.4
PTGS2	桑辛素 D Moracin D	-10.4	PTGS2	山奈酚 Kaempferol	-9.4
PTGS2	桑辛素 H Moracin H	-10.3	PTGS2	桑辛素 E Moracin E	-9.4
PTGS2	β -胡萝卜素 Beta-carotene	-9.8	PTGS2	降桂木生黄素 Norartocarpetin	-9.4
MMP9	槲皮素 Quercetin	-9.7	PTGS2	槲皮素 Quercetin	-9.4
PTGS2	海棠果素 E Inophyllum E	-9.7	CCND1	槲皮素 Quercetin	-9.3
PTGS2	黄酮 Chryseriol	-9.6	PTGS2	槲皮素 Diosmetin	-9.3
PTGS2	异鼠李素 Isorhamnetin	-9.6	PTGS2	木犀草素 Luteolin	-9.3
PTGS2	半齿泽兰素 Eupatorin	-9.5	PTGS2	四甲氧基木犀草素 Tetramethoxyluteolin	-9.3
PTGS2	鸢尾黄酮甲素 Irisectorigenin A	-9.5	MMP1	木犀草素 Luteolin	-9.1

读》),菊花“得金水之精英尤多,能益金水二脏也。补水所以制火,益金所以平木”(《本草纲目》),桑叶、菊花是临床常用的经典药对,虽为轻平之品,但可益肺平肝,使肾水充足,涵养肝性,清泄肝热,常用治疗高血压引起的眩晕、头疼、急躁易怒、面红目赤等症,但具体药学物质和作用机制仍不清楚。本研究运用网络药理学研究模式,筛选出桑叶-菊花与高血压 41 个共同作用蛋白,涉及活性成分 29 个,拓扑分析出 156 个核心靶点信息,39 条通路与高血压有关,体现了桑叶-菊花“多成分、多靶点、多途径”之间共同作用治疗高血压的机制。

根据表 2、图 2 可知,治疗高血压的主要活性成分可能有槲皮素、山奈酚、 β -胡萝卜素、花生四烯酸、金合欢素、木犀草素等,其中槲皮素、山奈酚为桑叶-菊花共有,槲皮素可减少氧化应激、干扰肾素-血管紧张素-醛固酮系统(RAAS)和以内皮依赖性和改善血管内皮-1(ET-1)和 NO 平衡,从而改善血管内皮功能,降低血压^[5]。山奈酚可内皮依赖性舒张血管,抑制血管紧张素Ⅱ导致的血管重构,还可通过抑制 IKK/NF- κ B 炎症损伤 IRS-1 改善Ⅱ型糖尿病大鼠的胰岛素抵抗,并对其具有调血脂作用^[6]。 β -胡萝卜素能降低低密度脂蛋白(LDL)氧化,消除自由基,预防血管损伤^[7]。花生四烯酸是桑叶所含脂类,有防治动脉粥样硬化和抗血栓的作用^[8]。金合欢素、木犀草素是菊花中含有的黄酮类化合物,菊花总黄酮可调节 NO 介导途径控制钙、钾离子通道,具

有保护血管舒张反应性、扩张血管等作用^[9],木犀草素还具有清除自由基和保护细胞能力,且在体内与其他抗氧化剂协同显著增加抗氧化作用。此外,收集到主要活性成分治疗高血压靶点 41 个,涉及多个炎症、抗氧化、血管生成、血管重构等因子,表明了桑叶-菊花可通过多成分、多靶点发挥协同降压作用。

网络拓扑分析是从蛋白相互作用网络体系中多层次、多角度地挖掘相关信息,并从中筛选出具有特定信号节点的多靶点药物分子,为预测药物与疾病之间的相互关系提供参考^[10]。本研究对 41 个关键靶点进行蛋白网络互作及拓扑参数分析,得到 1 个以 EGFR、JUN、PRKCA 为核心靶点的具有 156 个节点和 3 808 条边的靶点网络,一方面进一步筛选了关键靶点,一方面扩大了相关基因网络,为 GO 功能富集、KEGG 通路分析和分子对接验证提供了佐证。根据拓扑分析结果表 3、图 3,结合表 1 和图 2、6 可知,其中关键作用靶点有 JUN、MMP9、PTGS2、EGFR、CCND1、MMP1、SPP1、PRKCA、ELK1、IGFBP5、KIF5C、SH2D2A、MEP1B、F2、PZP 等。研究表明,高血压发病机制主要与 RAAS 激活、交感神经活动亢进、胰岛素抵抗、水钠潴留、膜离子转运异常及血管内皮功能紊乱等有关^[11],导致血管收缩、损伤、重构,血压升高。其中,Jun 激酶(JUN)通过转录调控调节 VSMCs 增殖、迁移、ROS 产生和胞外基质降解的细胞过程的多种基因^[12]。基质金属蛋白酶 9

(MMP9)参与正常生理过程中细胞外基质的分解,可通过释放血管内皮生长因子(VEGF)以参与血管生成,而基质金属蛋白酶1(MMP1)活性增高,高血压相关的微血管功能障碍的风险亦增高^[13]。前列素内环氧化物合成酶2(PTGS2)是一种诱导性即刻反应基因,受到细胞因子、炎性介质、缺氧等刺激可迅速上调,主要产物前列腺素具有促进细胞增殖、促进血管生成等生物学活性^[14]。表皮生长因子受体(EGFR)广泛分布于哺乳动物上皮细胞、成纤维细胞、角质细胞等细胞表面,对细胞的生长、增殖和分化等有重要作用,功能缺失或其相关信号通路关键因子活性异常,均会引起心血管疾病及免疫缺陷等发生^[15]。周期蛋白D1基因(CCND1)具有调节细胞周期、细胞生长、细胞分化的作用,在细胞受到损伤时启动子上游的LncRNA的转录产物可与TNA结合蛋白TLS结合^[16]。蛋白激酶C- α (PRKCA)基因是丝氨酸-苏氨酸特异性蛋白激酶C家族的成员,涉及血管平滑肌收缩和血管内皮生长因子通路,参与钙离子调控和血管平滑肌收缩^[17]。分子对接进一步证实了网络药理学的成分筛选结果,结果表明潜在靶点PTGS2、MMP9、MMP1与槲皮素、木犀草素,PTGS2与山奈酚、 β -胡萝卜素、金合欢素等具有较好的结合活性,而且结合体构象稳定,表明这些可能为桑叶-菊花治疗高血压的关键成分和靶点。

对关键靶点进行GO功能和KEGG通路富集分析,进一步探究桑叶-菊花治疗高血压的作用机制。结果发现,桑叶-菊花可能通过参与脂多糖的反应、对平滑肌细胞增殖的正向调节、缺氧反应、氧化还原过程、蛋白质分解代谢过程的调控等生物学过程,在细胞外空间、内质网膜、细胞膜筏等部位,发生酶结合、丝氨酸内肽酶活性、蛋白质均聚活性、血红素结合、蛋白质结合等分子反应,进而调控IL-17信号通路、流体剪切应力与动脉粥样硬化信号通路、TNF信号通路、癌症中的微小核糖核酸信号通路等发挥降压作用。TNF、IL-17信号通路与炎症反应有关^[18],TNF信号通路异常调节会导致血管内皮细胞受损,平滑肌细胞增生,血管外周阻力增加而引起高血压,IL-17信号通路可诱导多种组织和细胞中促炎细胞因子、趋化因子和金属蛋白酶的表达^[19]。流体剪切应力与动脉粥样硬化信号通路主要与血液流变学有关,较低的血流剪切力易导致动脉硬化形成或斑块破裂、内皮损伤,MMP-9、CRP水平升高,较高的血流剪切力有利于维持血管内皮的正常功能,保护血管

内膜,防止高血压的发生^[20]。microRNAs(miRNAs)是内源性非编码RNA小分子,主要在转录后水平调控基因表达,可以通过调控AT1R基因、盐皮质激素受体基因的表达,抑制RAAS的功能,减少水钠潴留,还可调控SRF、IRF、GAX等基因的表达,导致内皮功能紊乱,参与高血压的发生发展^[21]。同时,PTGS2、JUN、MMP1、MMP9、CXCL2等关键靶点也显著富集在这些通路上,充分证明了桑叶-菊花具有多靶点、多通路协同增效的降压作用。

综上,本文采用网络药理学和分子对接的方法系统地分析了桑叶-菊花治疗高血压的分子作用机制,揭示了桑叶-菊花可能通过槲皮素、山奈酚、 β -胡萝卜素、花生四烯酸、金合欢素、木犀草素等潜在药效成分,作用于JUN、MMP9、PTGS2、EGFR、CCND1、MMP1、PRKCA等多个靶点,通过IL-17信号通路、流体剪切应力与动脉粥样硬化信号通路、TNF信号通路和癌症中的微小核糖核酸信号通路等,参与血管舒缩、钙钠离子转运、血管内皮功能、炎症反应、糖脂代谢和氧化应激等发挥降压的作用,证明了桑叶-菊花治疗高血压具有多成分、多靶点、多通路协同作用的特点,为进一步探讨其发挥作用的药效物质基础和作用机制研究提供方向,其后续尚需体内外实验进一步证实其功效网络的内在关联和作用靶点。

参考文献

- Flack JM, Adekola B. Blood pressure and the new ACC/AHA hypertension guidelines [J]. Trends Cardiovasc Med, 2020, 30:160-164.
- Liu JT, Zhang T. Review on the mechanism and advantages of traditional Chinese medicine in preventing and treating hypertension [J]. J Tradit Chin Med (中医杂志), 2015, 56(1):77-82.
- Hu YS. Research on Professor Wang Yulin's academic thoughts and medication rules in the treatment of essential hypertension [D]. Guiyang: Guiyang College of Traditional Chinese Medicine(贵阳中医学院), 2017.
- Geraldes V, Laranjo S, Rocha I. Hypothalamic ion channels in hypertension [J]. Curr Hypertens Rep, 2018, 20(2):14.
- Felix B, John P. The importance of endothelin-1 for vascular dysfunction in cardiovascular disease [J]. Cardiovasc Res, 2007, 76(1):8-18.
- Li B, Lei SS, Li H, et al. Study on antihypertensive mechanism of Jimaitong tablets based on network pharmacology [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2019, 36(1):49-57.

- 7 Fan SS, Wang L, Wang XH, et al. Analysis of the relationship between antioxidant activity of mulberry leaves and rutin dose-effect [J]. Chin Tradit Pat Med(中成药), 2020, 42: 783-787.
- 8 Su FH. Research progress on chemical constituents and clinical application of mulberry leaves [J]. Chin Med Her(中国医药导报), 2010, 7(14): 9-12.
- 9 He DX, Ru XC, Wen L, et al. Total flavonoids of Flos Chrysanthemi protect arterial endothelial cells against oxidative stress [J]. J Ethnopharmacol, 2012, 139(1): 68-73.
- 10 Xie J, Gao S, Li L, et al. Research progress and application strategy of network pharmacology in the field of traditional Chinese medicine [J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2019, 50: 2257-2265.
- 11 Leimena C, Qiu H. Non-coding RNA in the pathogenesis, progression and treatment of hypertension [J]. Int J Mol Sci, 2018, 19(4): 927.
- 12 Xu XL. Role of NONO protein in vascular remodeling disease model and its mechanism of gene regulation [D]. Jinan: Shandong University(山东大学), 2020.
- 13 Liu Y, Zhang YM. Research progress of matrix metalloproteinases and their inhibitors in hypertension [J]. Adv Card Dis ea(心血管病学进展), 2013, 34: 818-822.
- 14 Mardi GM, Ioana P. Prostacyclin therapy for pulmonary arterial hypertension: new directions [J]. Semin Respir Crit Care Med, 2005, 26(4): 394.
- 15 Ceresa BP, Peterson JL. Cell and molecular biology of epidermal growth factor receptor [J]. Int Rev Cell Mol Biol, 2014, 313: 145-178.
- 16 Zhu XQ, Liu ZQ, Wang BL. Study on the mechanism of quercetin against cervical cancer based on biomolecular network and molecular docking [J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2020, 32(1): 23-31.
- 17 Zhao YY. PKC α -P120ctn-NF- κ B signaling pathway participates in the mechanism of vascular endothelial injury under fluid shear stress [D]. Nanchang: Nanchang University(南昌大学), 2020.
- 18 Zhang JL, Li H, Wang WJ, et al. Investigation on the mechanism of Salviae Miltiorrhizae-Cortex Moutan against cerebral ischemic injury based on network pharmacology [J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2021, 33: 103-113.
- 19 Wu J, Saleh MA, Kirabo A, et al. Immune activation caused by vascular oxidation promotes fibrosis and hypertension [J]. J Clin Invest, 2016, 126(1): 50-67.
- 20 Na RS, Wang XY, Ding HT, et al. Difference analysis of carotid blood flow shear force, MMP-9 and CRP expression between normal blood pressure and hypertension [J]. Med Recapit(医学综述), 2019, 25: 4747-4751.
- 21 Kriegel AJ, Baker MA, Liu Y, et al. Endogenous microRNAs in human microvascular endothelial cells regulate mRNAs encoded by hypertension related genes [J]. Hypertension, 2015, 66: 793-799.

(上接第 877 页)

- 19 Hao LX, Lu R, Ma XX, et al. Effect of diosmetin on acute lung injury induced by meconium and its mechanism in neonatal rats [J]. Lab Anim Comp Med(实验动物与比较医学), 2020, 40: 384-390.
- 20 Wu JT, Leung K, Leung GM. Nowcasting and forecasting the potential domestic and international spread of the 2019-nCoV outbreak originating in Wuhan, China: a modelling study [J]. Lancet, 2020, 395: 689-697.
- 21 Huang C, Wang Y, Wang X, et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China [J]. Lancet, 2020, 395: 497-506.
- 22 Dong JQ, He J, Liu WL. Effects of paeoniflorin on the Expression of IL-1, IL-6 and TNF- α of inflammatory annulus fibrosus cells [J]. Asia Pac Tradit Med(亚太传统医学), 2018, 14(6): 8-12.
- 23 Li Y, Wang CF, Zhang RH, et al. Kaempferol attenuates acute lung injury in mice induced by swine-origin influenza A H9N2 virus via down-regulation of NF- κ B signaling pathway [J]. Chin J Pathophysiol(中国病理生理杂志), 2017, 33: 315-321.