

DOI: 10.16210/j.cnki.1007-7561.2022.03.015

宋晓漫, 李文林, 杨丽丽, 等. 桑椹防治肝肾阴虚型冠心病成分与作用机制分析[J]. 粮油食品科技, 2022, 30(3): 137-147.

SONG X M, LI W L, YANG L L, et al. Research on the ingredients and mechanisms of mulberry in the prevention and treatment of coronary heart disease of liver and kidney yin deficiency[J]. Science and Technology of Cereals, Oils and Foods, 2022, 30(3): 137-147.

桑椹防治肝肾阴虚型冠心病 成分与作用机制分析

宋晓漫¹, 李文林^{1,2}✉, 杨丽丽^{2,3}, 曾莉³

(1. 南京中医药大学 针灸推拿养生康复学院, 江苏 南京 210023;

2. 南京中医药大学, 江苏省中药资源产业化过程协同创新中心, 敬文图书馆, 江苏 南京 210023;

3. 南京中医药大学 第一临床医学院, 江苏 南京 210023)

摘要: 基于网络药理学和分子对接研究桑椹防治肝肾阴虚型冠心病成分与潜在作用机制。运用 TC MSP、TC MID、Swiss Target Prediction、GeneCards 等数据库并结合文献报道获得桑椹防治肝肾阴虚型冠心病有效活性成分和共同作用靶点, 运用 Cytoscape 软件生成成分-靶点-疾病相互作用网络图, 通过 STRING 数据库进行 PPI 网络的构建与分析, 然后借助 DAVID 数据库进行 GO 功能分析及 KEGG 通路富集分析, 最后利用薛定谔软件对重要活性成分与关键靶点进行分子对接验证。获得桑椹有效活性成分 14 个, 134 个靶基因与肝肾阴虚型冠心病相关。预测靶基因主要作用于 TNF、PI3K/Akt 等信号通路通过调控炎症、凋亡反应以及血液循环来防治肝肾阴虚型冠心病。分子对接结果表明重要活性成分与候选靶蛋白存在较好的结合性。初步揭示桑椹能够多成分、多靶点、多通路地防治肝肾阴虚型冠心病, 研究结果可为桑椹及防治肝肾阴虚型冠心病功能食品的开发提供理论参考和新的研究方向。

关键词: 桑椹; 冠心病; 肝肾阴虚; 网络药理学; 分子对接; 作用机制

中图分类号: R256.2 文献标识码: A 文章编号: 1007-7561(2022)03-0137-11

网络首发时间: 2022-04-29 14:44:55

网络首发地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3863.TS.20220429.1412.010.html>

Research on the Ingredients and Mechanisms of Mulberry in the Prevention and Treatment of Coronary Heart Disease of Liver and Kidney Yin Deficiency

SONG Xiao-man¹, LI Wen-lin^{1,2}✉, YANG Li-li^{2,3}, ZENG Li³

(1. College of Acupuncture, Massage, Health Preservation and Rehabilitation, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing, Jiangsu 210023, China; 2. Jingwen Library, Collaborative Innovation Center for the

Industrialization Process of Chinese Medicine Resources, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing,

Jiangsu 210023, China; 3. School of First Clinical Medicine, Nanjing University of

Chinese Medicine, Nanjing, Jiangsu 210023, China)

Abstract: To explore the ingredients and possible mechanisms of Mulberry for controlling coronary heart

收稿日期: 2022-01-10

基金项目: 国家重点研发计划项目(2017YFC1703506); 药食同源食材健康功效数据库建设(2019007)

Supported by: National Key Research and Development Project of China (No. 2017YFC1703506); Construction of Health Efficacy Database of Medicinal and Food Homologous Ingredients (No. 2019007)

作者简介: 宋晓漫, 女, 1993 年出生, 在读硕士生, 研究方向为药食同源大数据挖掘分析。E-mail: 20190209@njucm.edu.cn.

通讯作者: 李文林, 女, 1973 年出生, 博士, 教授, 研究方向为药食同源文献分析挖掘。E-mail: njliwl@njucm.edu.cn.

disease of liver and kidney yin deficiency based on network pharmacology and molecular docking. The active components and common targets of Mulberry combating coronary heart disease of liver and kidney yin deficiency were obtained from TCMSP, TCMID, Swiss TargetPrediction, and GeneCards databases; cytoscape software was used to generate component-target-disease interaction network diagram. PPI network was constructed and analyzed by STRING database; with the help of DAVID database, the GO function analysis and KEGG pathway enrichment analysis were carried out, and finally Schrödinger Maestro was used to verify the molecular docking of main active ingredients and key targets. There were 14 active components in Mulberry, and 134 target genes were associated with coronary heart disease of liver and kidney yin deficiency. Predicted target genes mainly acted on TNF, PI3K/AKT signaling pathways to prevent and treat coronary heart disease with liver and kidney yin deficiency by regulating inflammation, apoptosis and blood circulation. Molecular docking results showed that the main active ingredients had good binding properties with candidate target proteins. The study preliminarily reveals that Mulberry can prevent and treat coronary heart disease of liver and kidney yin deficiency through multi- components, multi-targets and multi-pathways. The results can provide theoretical reference and new research direction for the development of Mulberry and functional foods for controlling the coronary heart disease of liver and kidney yin deficiency.

Key words: mulberry; coronary heart disease; liver and kidney yin deficiency; network pharmacology; molecular docking; mechanism

冠心病 (coronary heart disease, CHD) 又称冠状动脉粥样硬化性心脏病, 是由于血脂异常、动脉粥样硬化等因素致使管腔狭窄或闭塞, 进而引发心肌缺血、缺氧或坏死的一种复杂慢性炎症性疾病^[1]。中医将其归为“胸痹”“心悸”“真心痛”等范畴。近年来, 随着社会压力的增大, 不健康生活方式的流行, 心血管患病率逐年提升。据世界卫生组织报道^[2], 全球有 7.3 亿人死于 CHD, 预计到 2030 年将达到 23.3 亿人次。在我国, CHD 是造成城乡居民死亡的主要病因之一, 截止到 2016 年死亡病例数高达 173.6 万, 已成为心血管疾病中威胁人类健康的第二大疾病^[3]。研究表明, 食品是影响机体功能和健康状态的主要因子^[4], CHD 的发生、发展及防治与其有着密切的关系, 日常摄取对于 CHD 的防治具有重要意义。

桑椹 (*Mori Fructus*) 是桑树的成熟果实, 又名桑果、桑枣等, 性寒, 味甘、酸, 归心、肝、肾经, 具有“滋阴补血, 生津润燥”的功效, 主治肝肾阴虚证^[5], 也是国家卫生部首次批准的“药食同源”物品之一, 不仅可以应用于临床, 亦可以用于食品、茶饮料等贯穿于日常生活。古代医籍中有较多其防病治病的记载, 《新修本草》述其“单食, 止消渴”^[6], 《养生类纂》记载其“补五

脏, 和经脉, 通血气”^[7]。现代已有药理研究指出桑椹中含有多糖类、黄酮类、花色苷、白藜芦醇等多种化学成分, 对于肥胖、血脂、血压等心血管相关疾病存在较好的调节作用, 结合其性味归经, 推测其在防治肝肾阴虚型 CHD 方面具有较大的开发价值^[8-12]。

网络药理学是基于系统生物学理论对中药进行多成分、多靶点、多通路的挖掘, 与中医学整体观念和辨证论治思想存在诸多相似之处, 是中医药新药研发和向现代化迈进的新方法, 已广泛应用于中医药研究领域^[13]。因此, 本研究运用网络药理学方法并结合分子对接对桑椹防治肝肾阴虚型冠心病成分与作用机制进行挖掘, 以期防治肝肾阴虚型冠心病功能食品的开发以及桑椹的广泛应用提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 桑椹活性成分及候选靶基因的收集

运用中药系统药理学数据库和分析平台 (Traditinal Chinese Medicine Systems Pharmacology Database and Analysis Platform, TCMSP, <http://ibts.hkbu.edu.hk/LSP/tcmsp.php>) 及中医药综合数据库 (Traditional Chinese Medicines Integrated Database, TCMID, <http://www.megabionet.org/tcmid/>), 以“桑

榭”或“SANG SHEN”为检索词，检索其全部化学成分，以口服生物利用度（OB） $\geq 30\%$ ，类药性（DL） ≥ 0.18 为筛选条件并结合文献报道获得桑榭有效活性成分信息。

1.2 活性成分对应靶基因的预测

利用 TCMSP 以及 Swsiss Target Prediction (<http://www.swisstargetprediction.ch/>) 数据库预测桑榭有效活性成分的潜在作用靶基因。其中，Swsiss Target Prediction 数据库设置种属为“homo sapiens”，选择 probability >0.1 的靶基因，并将其在 UniProt (<https://www.uniprot.org/>) 数据库中进行基因名称的标准化处理。

1.3 肝肾阴虚型冠心病相关基因的获取

以“coronary heart disease”为关键词，检索 GeneCards 数据库和在线《人类孟德尔遗传》数据库(Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM)，获得冠心病相关疾病靶基因，由于 GeneCards 数据库中基因较多，故筛选 Relevance score ≥ 20 的部分，OMIM 靶点则全部纳入，然后去除二者重复的靶基因，建立冠心病疾病基因数据集。

参照《中药新药临床研究指导原则》^[14]的相关内容制定肝肾阴虚型冠心病的辨证要点：（1）胸闷隐痛、心悸盗汗；（2）心烦不寐、头晕耳鸣；（3）腰膝酸软；（4）舌红少津，脉细数。利用 GeneCards 数据库以“chest tightness and pain”、“night sweats and palpitations”、“upset and insomnia”、“dizziness and tinnitus”、“sore waist and knee”、“red tongue”、“pulse counting”为检索词依次检索其相应的靶基因，去重合并后与冠心病疾病基因进行整合，即为肝肾阴虚型冠心病的疾病基因。再将肝肾阴虚型冠心病的疾病基因与桑榭活性成分对应靶基因取交集，交集基因即为桑榭防治肝肾阴虚型冠心病的潜在作用靶标。

1.4 构建可视化网络图

剔除重复的且与疾病没有关联的靶基因，建立药物-活性成分-靶点-疾病数据文件，再导入 Cytoscape3.7.2 构建桑榭活性成分-靶点-疾病 (compounds-targets-CHD network, C-T-CHD) 网络图，以展示桑榭活性成分、靶点与肝肾阴虚型冠心病之间的相互作用关系。

1.5 桑榭-肝肾阴虚型冠心病蛋白质相互作用 (protein protein interaction, PPI) 网络的构建

将桑榭与肝肾阴虚型冠心病的交集靶点输入 STRING 数据库 (<http://string-db.org>)，物种设定为“人”，获得蛋白质相互作用关系，然后将所得数据导入 Cytoscape3.7.2 软件中，利用插件“Generate Style from Statistics”得到 PPI 网络图。再利用“Network Analyzer”插件分析网络拓扑参数，选取度值 (degree centrality, DC)、中介中心度 (betweenness centrality, BC)、接近中心性 (closeness centrality, CC) 均大于平均值的节点作为核心作用靶蛋白。同时利用 Cytoscape 的 MCODE 插件，以 degree cut off=2, node score cut off=0.2, K-score=2, max depth=100 为筛选条件筛选网络中重要的蛋白互作模块。

1.6 GO 功能注释与 KEGG 通路富集分析

将桑榭与肝肾阴虚型冠心病交集靶点导入 DAVID (<https://david.ncifcrf.gov/>) 数据库获得交集靶基因基因本体 (gene ontology, GO) 功能注释和京都基因与基因组百科全书(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG) 通路富集分析。根据 P 值 ($P < 0.05$)，错误发现率 ($FDR < 0.05$) 对生物过程、细胞组分、分子功能以及代谢通路进行筛选，再进行相关分析。

1.7 分子对接

首先从 PubChem 数据库下载桑榭候选成分 3D 结构信息，从 PDB 数据库 (<http://www.rcsb.org/>) 下载候选靶蛋白晶体结构信息 (PDB ID: 4GV1、6NJS、4KZN)，并导入薛定谔软件 (Schrödinger Maestro)，利用 Protein Preparation Wizard 模块对靶蛋白受体进行加氢、结构优化、能量优化等处理，最后采用 Glide 模块进行分子对接运算及分析，对接方法为标准精度法 (Standard Precise, SP)，具体参数均按默认设置，再利用 Pymol 2.1 软件进行可视化分析。

2 结果与分析

2.1 桑榭活性成分的筛选

从 TCMSP 中收集到桑榭化学成分 91 种，TCMID 中 83 种，根据筛选条件 $OB \geq 30\%$ ， DL

≥0.18 并结合文献报道得到活性成分 55 种, 再根据各自的 SMILES 通过 TCMSp 和 Swiss Target Prediction 数据库进行相应成分靶基因的预测, 删除同疾病无关联和没有靶基因的成分, 最终获得有效成分 14 个, 包括槲皮素、山奈酚、亚油酸等 (具体见表 1), 对应候选靶基因 475 个, 提示桑椹中黄酮类、酚酸类、生物碱类化合物可能多靶点的对机体发挥防治作用。

表 1 桑椹有效活性成分表

Table 1 Active ingredients of mulberry

编号	PubChem 编号	中文名称	度值	英文名称
M1	11438306	环(L-酪氨酰基-L-苯丙氨酰基)	27	Cyclo(L-tyrosyl-L-phenylalanyl)
M2	5280343	槲皮素	23	quercetin
M3	44143979	蜕皮甾酮	23	ecdysterone
M4	5281426	7-羟基香豆素	19	7-hydroxy coumarin
M5	5867807	亚油酸	13	linoleic acid
M6	25202062	山奈酚	8	kaempferol
M7	21575037	桑树素 A	6	mulbaine A
M8	5280489	β-胡萝卜素	5	beta-carotene
M9	54710367	咖啡酸	5	caffeic acid
M10	53399169	芦丁	4	rutin
M11	1548910	白藜芦醇	4	cis-resveratrol
M12	370	没食子酸	4	gallic acid
M13	101866713	二氢呋喃甲酯 A	4	divaricataester A
M14	25203368	异槲皮素	3	isoquercetin

2.2 桑椹防治肝肾阴虚型冠心病的潜在作用靶基因

通过 TCMSp 和 Swiss Target Prediction 数据库, 获得桑椹有效活性成分最终作用靶基因 475 个, GeneCards 数据库获得冠心病相关靶基因 868 个, OMIM 数据库 547 个, 剔除重复值后获得冠心病最终作用靶基因 1 345 个。将肝肾阴虚型相关基因与冠心病最终作用靶基因取交集, 获得肝肾阴虚型冠心病候选靶基因 884 个。再利用 Venn 图将桑椹有效活性成分最终作用靶基因与肝肾阴虚型冠心病候选靶基因进行映射, 最终获得 134 个交集靶基因 (图 1), 即为桑椹防治肝肾阴虚型冠心病的潜在作用靶基因, 表明桑椹可以多靶点的防治肝肾阴虚型冠心病。

2.3 桑椹-活性成分-疾病-靶基因网络图的构建 (C-T-D)

将桑椹与肝肾阴虚型冠心病 134 个交集靶基

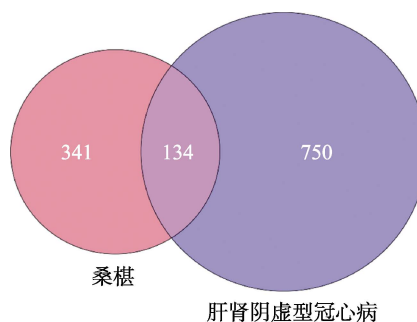


图 1 桑椹与肝肾阴虚型冠心病的交集靶基因

Fig. 1 Intersection target genes of mulberry and CHD of liver and kidney yin deficiency syndrome

因信息导入 Cytoscape3.7.2 进行药物-成分-靶点-疾病 (C-T-D) 的网络可视化 (见图 2)。图 3 中共有 150 个节点 (1 个药物、1 个疾病、14 个活性成分、134 个与疾病相关的靶基因), 282 条边线, 其中圆形代表化学成分, 菱形代表交集靶点, 三角形代表药物与疾病, 度值越高, 节点越大。如图所示, 环 (L-酪氨酰基-L-苯丙氨酰基)、槲皮素、蜕皮甾酮、7-羟基香豆素、亚油酸及山奈酚等的度值较高, 提示桑椹中这几个活性成分在防治肝肾阴虚型冠心病方面发挥着关键作用。

2.4 蛋白质与蛋白质相互作用关系 (PPI) 网络的构建

将 134 个交集靶蛋白导入 String 数据库获得这些靶蛋白的 PPI 网络数据, 设置最低置信度为 0.9, 将结果以 tsv 形式导出。再把数据导入 Cytoscape3.7.2 软件进行相关分析及网络可视化。如图 3 所示, 图中 116 个靶蛋白之间具有 548 种相互作用关系, 圆形节点代表靶蛋白, 圆圈越大、颜色越亮表明靶蛋白度值越大, 线条越粗、颜色越亮表明蛋白之间相互作用关系越密切。再利用 “Network Network” 插件分析网络拓扑参数, 选取度值 (degree centrality, DC) 中介中心度 (betweenness centrality, BC)、接近中心性 (closeness centrality, CC) 均大于平均值的节点作为核心靶蛋白。网络中各节点度值平均值为 9.448, 中介中心度平均值为 0.015, 接近中心性平均值为 0.374。网络中 DC、BC、CC 均大于平均值的靶蛋白共 26 个 (表 2), 包括 STAT3、PIK3CA、PIK3R1、SRC、VEGFA、AKT1、MAPK1、PTPN11、HSP90AA1、EGFR、MAPK3、TP53、EGF、APP、TNF、MAPK8、INS、ESR1、MAPK14、

F2、RB1、MMP9、PLG、MMP2、NOS2、PTGS2，提示这些可能是桑椹防治肝肾阴虚型冠心病的关键作用靶蛋白。同时运用 Cytoscape3.7.2 软件中

的 MCODE 插件对桑椹靶蛋白 PPI 网络进行聚类分析（图 4），得到作用较显著的 2 个模块（见图 4、表 3）。

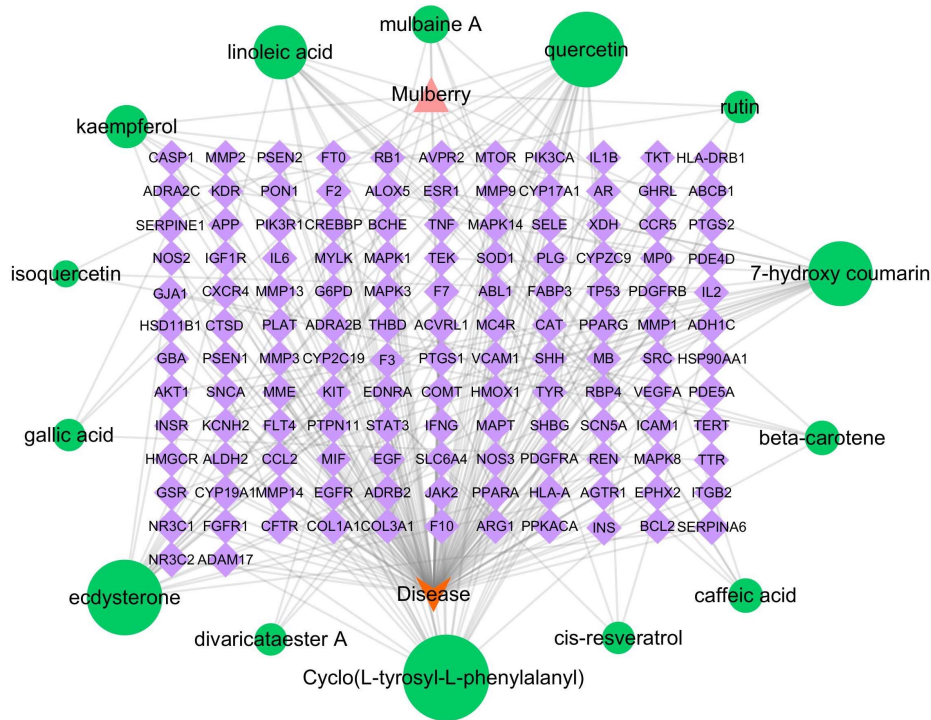


图 2 C-T-D 网络图
Fig.2 C-T-D network

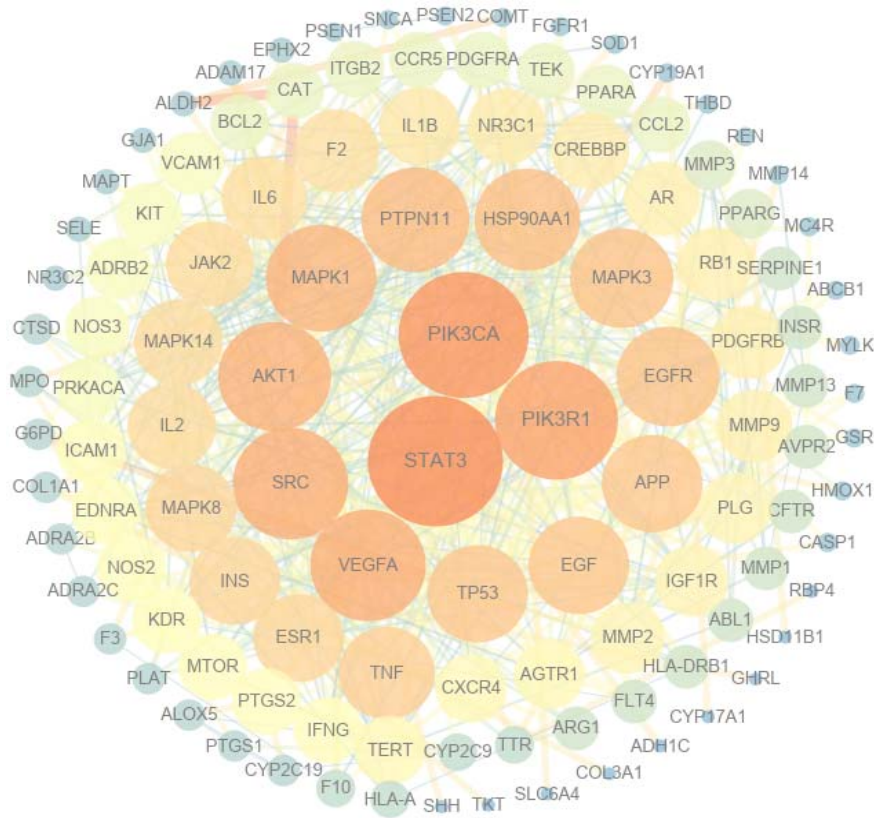


图 3 药物-疾病相关蛋白靶点 PPI 网络
Fig.3 Drug-disease related protein target PPI network

表 2 核心作用靶蛋白信息
Table 2 Information of core role target proteins

靶蛋白	中文全称	度值	化合物	靶蛋白	中文全称	度值	化合物
STAT3	信号传导及转录激活因子 3	37	M1	APP	淀粉样 β 前体蛋白	23	M6
PIK3CA	磷脂酰肌醇 4,5-二磷酸 3 激酶催化亚基 α 亚型	35	M3	TNF	肿瘤坏死因子	21	M3
PIK3R1	磷脂酰肌醇 3-激酶调节亚基 α	32	M6	MAPK8	丝裂原活化蛋白激酶 8	19	M3
SRC	原癌基因酪氨酸蛋白激酶 Src	29	M4	INS	胰岛素	19	M10
VEGFA	血管内皮细胞生长因子 A	29	M8	ESR1	雌激素受体 1	19	M4
AKT1	RAC- α 丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶	28	M4	MAPK14	丝裂原活化蛋白激酶 14	18	M5
MAPK1	丝裂原活化蛋白激酶 1	27	M1	F2	凝血因子 2	17	M1
PTPN11	酪氨酸蛋白磷酸酶非受体 11 型	26	M3	RB1	视网膜母细胞瘤相关蛋白	13	M2
HSP90AA1	热休克蛋白 90 α	25	M4	MMP9	基质金属蛋白酶 9	13	M9
EGFR	表皮生长因子受体	24	M4	PLG	纤溶酶原	12	M1
MAPK3	丝裂原活化蛋白激酶 3	24	M3	MMP2	基质金属蛋白酶 2	12	M9
TP53	细胞肿瘤抗原 p53	23	M2	NOS2	一氧化氮合酶 2	10	M3
EGF	表皮生长因子	23	M2	PTGS2	前列腺素内过氧化物合酶 2	10	M1

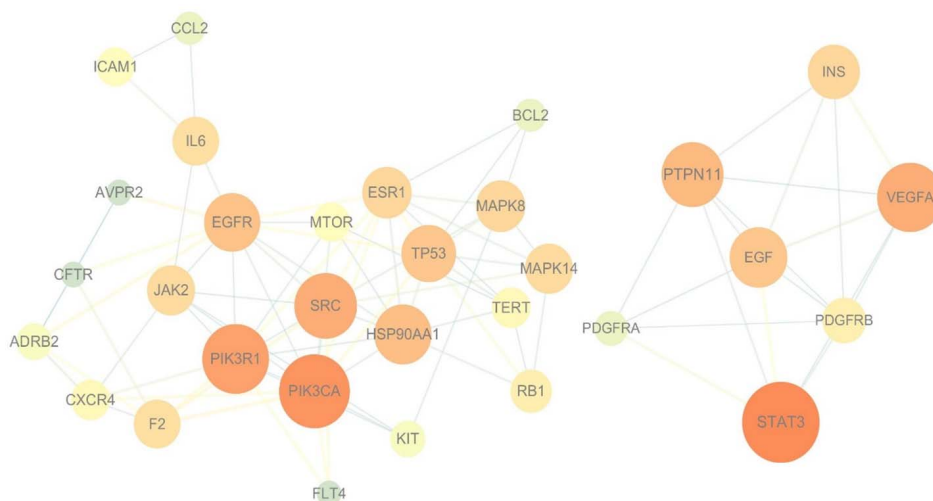


图 4 基于 MCODE 的蛋白互作模块
Fig.4 Protein interaction module based on MCODE

表 3 桑椹 PPI 网络聚类分析结果
Table 3 Clustering analysis results of Mulberry PPI network

类簇	靶蛋白	节点数	边数	聚类评分
a	PIK3CA、PIK3R1、SRC、HSP90AA1、EGFR、TP53、ESR1、MAPK8、MAPK14、JAK2、IL6、F2、RB1、CXCR4、TERT、MTOR、ICAM1、ADRB2、KIT、BCL2、CCL2、AVPR2、CFTR、FLT4	24	73	6.348
b	STAT3、VEGFA、PTPN11、EGF、INS、PDGFRB	7	18	6

2.5 GO 生物过程分析

利用 David (<https://david.ncifcrf.gov/>) 数据库对 134 个交集基因进行 GO 功能注释, 根据 $P < 0.05$, $FDR < 0.05$ 筛选出生物过程 228 条、细胞组分 35 条、分子功能 51 条, 以图形的形式分别展示前 15 个条目 (图 5)。其中, 生物过程主要涉及一氧化氮生物合成过程正调控、对缺氧的反应、细胞迁移正调控、凋亡过程负调控以及对药

物的反应等方面; 细胞组分主要涉及细胞外空间、细胞表面、小窝、膜筏及细胞外泌体等方面; 分子功能则主要涉及与酶、受体、血红素、蛋白质的结合及蛋白质酪氨酸激酶活性等方面, 体现出桑椹防治肝肾阴虚型冠心病多途径的作用效果。

2.6 KEGG 通路富集分析

利用 DAVID 数据库对桑椹防治肝肾阴虚型冠心病的交集靶基因进行 KEGG 通路富集分析,

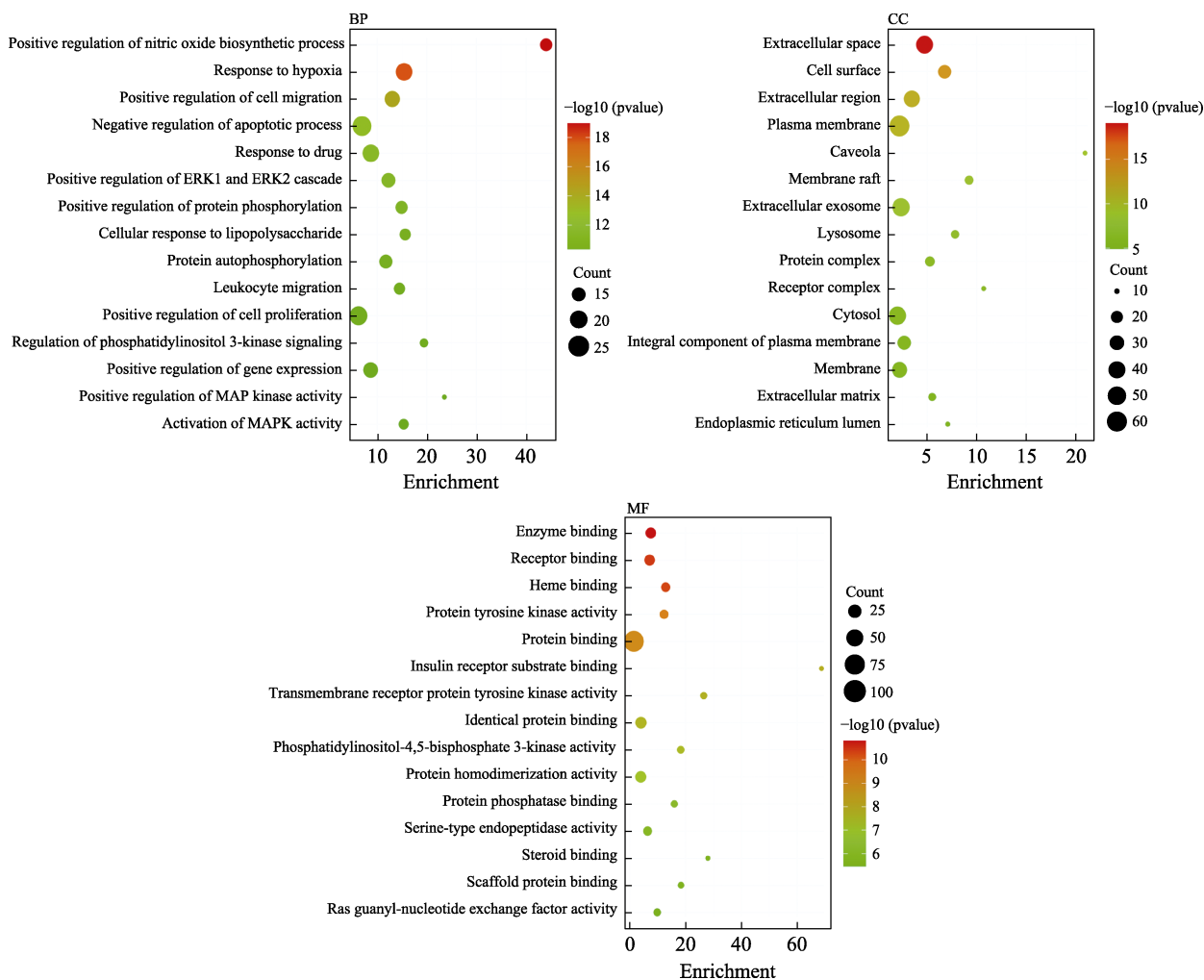


图 5 GO 生物过程、细胞组分、分子功能分析
Fig.5 GO biological process, cell component, molecular function analysis

共获得 110 条通路信息 ($P < 0.05$, $FDR < 0.05$), 结合文献找出与肝肾阴虚型冠心病相关的通路, 并展示 15 个条目 (见图 6)。其中与炎症、免疫相关通路 4 条: TNF 信号通路、NOD 样信号通路、Toll 样信号通路、MAPK 信号通路; 与凋亡、代

谢相关信号通路 3 条: PI3K/Akt 信号通路、FoxO 信号通路、mTOR 信号通路; 与血液循环相关信号通路 2 条: HIF-1 信号通路、VEGF 信号通路。结果表明桑椹可能通过作用于这些信号通路发挥防治肝肾阴虚型冠心病的作用。

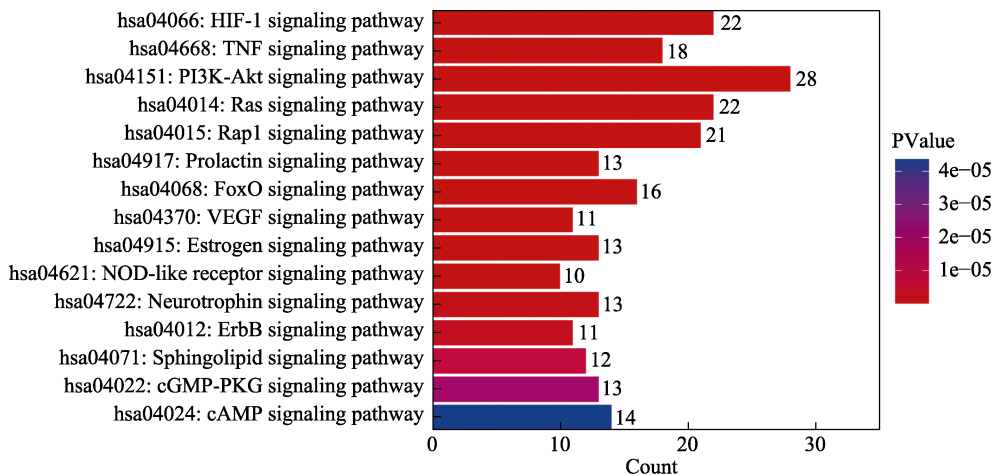


图 6 KEGG 通路富集条形图
Fig.6 KEGG pathway enrichment bar graph

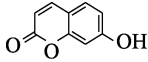
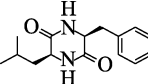
2.7 分子对接结果验证

利用薛定谔软件中的 Glide 模块进行分子对接, 对接结果见表 4、图 7 (图中 A、B 显示化

物与 AKT1 的结合模式, C、D 显示化合物与 STAT3 的结合模式, E、F 显示化合物与 VEGFA 的结合模式)。

表 4 桑椹关键活性成分与靶蛋白对接结果

Table 4 Results of docking of key active components of mulberry with target protein

化合物	结构式	结合能/(kcal/mol)		
		AKT1	STAT3	VEGFA
7-羟基香豆素		-7.44	-7.65	-7.15
(L-酪氨酰基-L-苯丙氨酰基)		-6.99	-6.78	-7.01

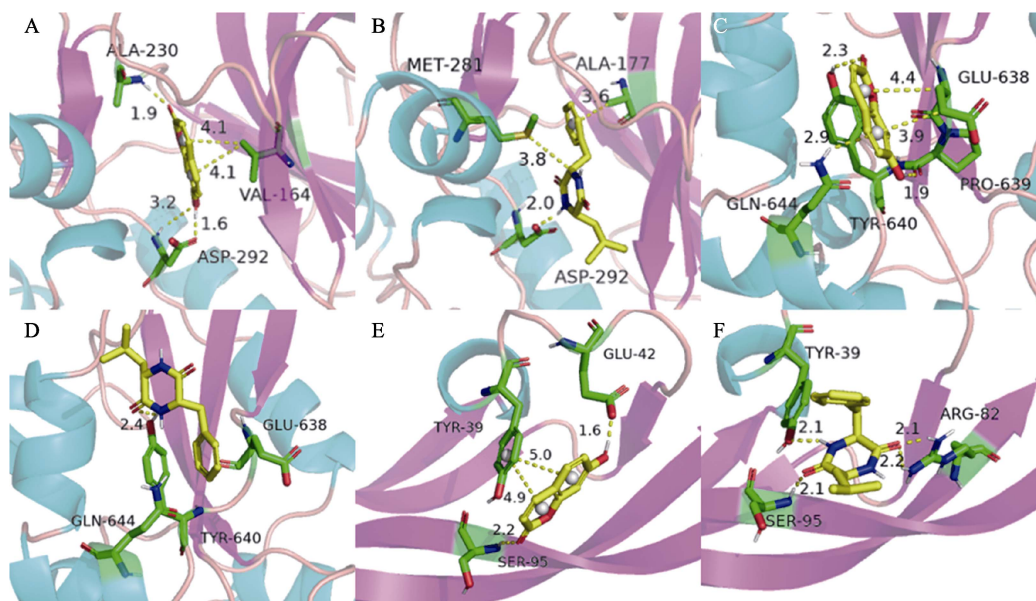


图 7 化合物与目标靶蛋白结合方式

Fig.7 The binding mode of compound with target protein

3 讨论

作为慢性非传染性疾病, 冠心病的发病机制尚不明确, 目前广泛研究的有脂肪浸润学说、内皮损伤反应学说、炎症学说等, 与肥胖、高血脂、高血压等危险因素密切相关^[15]。桑椹作为典型的药食两用中药材, 现代药理研究已指出其多种化学成分对于肥胖、血脂、血压等心血管相关疾病存在较好的调节作用, 彰显出其在防治冠心病方面的独特优势。本研究进一步结合其性味归经, 运用网络药理学和分子对接方法对其防治肝肾阴虚型冠心病成分与作用机制进行系统的验证与探讨。

成分靶点结果显示, 桑椹中环 (L-酪氨酰基-L-苯丙氨酰基)、槲皮素、蜕皮甾酮、7-羟基香豆

素、亚油酸及山奈酚等活性成分在防治肝肾阴虚型 CHD 方面发挥关键作用。

据报道, 槲皮素具有抗炎、抗氧化、降血脂、保护心血管等多重生物活性, 能够抑制炎症细胞因子的产生, 减轻冠状动脉结扎大鼠的缺血再灌注损伤, 同时亦能够舒张血管, 改善内皮细胞并抑制低密度脂蛋白氧化^[16-17]。蜕皮甾酮在心血管疾病方面存在积极的改善和治疗作用, 能够通过抑制细胞凋亡和氧化应激, 改善心律失常及心肌梗死发挥心血管保护作用^[18]。作为人体必需脂肪酸的亚油酸, 主要参与机体脂肪分解、新陈代谢及免疫调节, 降低血清胆固醇, 进而抑制动脉血栓的形成, 在预防动脉粥样硬化和心血管疾病方面具有良好作用^[19]。现有研究指出饮食一定剂量的亚油酸与 CHD 患病风险呈负相关^[20]。山奈酚

具有十分明显的抗氧化功能和抗炎活性,能够清除自由基,抑制脂质过氧化,增强抗氧化酶活性,还能够调节促炎酶活性和炎症相关基因表达,抑制炎症的发生发展^[21]。由此可见,桑椹中黄酮类、脂肪酸及植物甾醇等成分具有不同程度的抗炎、抗氧化、降血脂等生物功能,对冠心病危险因素如高血脂、动脉粥样硬化等以及冠心病引起的炎症反应、氧化应激、血管损伤产生直接或间接的防治作用。此外,本次研究还预测出环(L-酪氨酰基-L-苯丙氨酰基)和7-羟基香豆素对于肝肾阴虚型CHD的防治作用较显著,但目前关于其文献报道较少,故对其进行进一步的分子对接验证。

其次通过构建、分析PPI网络并结合文献报道发现,桑椹防治肝肾阴虚型CHD的核心靶蛋白有STAT3、VEGFA、AKT1等。其中,STAT3是STAT蛋白家族成员,是细胞内重要的信号传递分子,有报道称STAT3及其相关通路参与慢性炎症、细胞生长、凋亡等多种生命活动,在动脉粥样硬化及心血管相关疾病的发生发展过程中发挥重要的调控作用^[22]。研究显示,敲除STAT3基因小鼠主动脉粥样硬化面积较对照组小鼠明显减少,且当心肌缺血缺氧时,JAK通路被激活,进而磷酸化STAT3,调控凋亡基因表达,抑制心肌细胞凋亡,延缓心肌损伤^[23-24]。VEGF是一种高度特异性的促血管内皮细胞生长因子,VEGFA作为其中一个亚型是血管生成和血管通透性的主要调节剂,对缺氧和营养匮乏情况下心血管生成作用尤为显著,其亦被认为是一种促炎细胞因子,在动脉粥样硬化及斑块不稳定性中具有一定作用^[25-27]。临床研究表明^[28],发生心肌梗死患者体内VEGFA分泌增加,进而促进血管生成和内皮细胞增殖,加快自我修复保护心脏,而低水平的VEGFA则是主要不良心血管事件的独立危险因素。AKT1是丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,属于蛋白激酶B家族成员之一,具有调控炎症反应、细胞代谢、基因转录、新生血管形成等多种生物学功能,在诸如动脉粥样硬化等心血管病理过程中发挥重要作用^[29]。AKT1基因的缺失诱发血管内皮细胞功能障碍及平滑肌细胞迁移与存活能力的降低,加速动脉粥样硬化、冠状动脉阻塞及斑块的脱落,进而对机体产生不可逆的影响^[30]。此外,通过对桑椹靶蛋

白PPI网络聚类分析后得到2个作用模块,其中作用较显著的a模块中包含有MAPK8、MAPK14、JAK2、IL6、CXCR4及PIK3CA、BCL2等与炎症和凋亡相关的基因,进一步提示桑椹可能是通过调节炎症、凋亡反应来发挥防治作用。

进一步的,KEGG通路富集分析结果表明,桑椹对肝肾阴虚型CHD的防治作用涉及与炎症免疫,凋亡代谢,血液循环相关的多条信号通路。如TNF信号通路、NOD样信号通路、PI3K/Akt信号通路、FoxO信号通路、HIF-1信号通路等。

据报道,炎症在动脉粥样硬化及冠心病病理过程中起着关键作用^[31]。TNF作为具有多种生物效应的细胞因子,可介导细胞凋亡及各种炎症性反应。研究表明,激活TNF信号通路不仅能够诱导血管内皮细胞、平滑肌细胞损伤,诱导单核细胞迁移并与内皮细胞黏附以及泡沫细胞的形成,同时还能够促进炎症因子的释放,影响斑块的稳定性,加重动脉粥样硬化的发生^[32]。NOD样受体是一种胞浆识别受体,家族成员有NOD1、NOD2、NLRP3等,主要参与机体免疫应答和炎症反应,病理状态下其通路的激活能够活化NF- κ B和MAPK信号通路,诱导细胞凋亡释放炎症因子,加速内皮细胞损伤,导致血管炎症及结构改变,促进动脉疾病的发生发展^[33]。细胞凋亡参与冠心病病理过程,且与冠状动脉病变严重程度呈正相关。PI3K/AKT信号通路作为重要的凋亡通路,在CHD、代谢紊乱等多种疾病的病理形成过程中发挥重要作用。PI3K/AKT信号通路不仅可以直接抑制其下游调节细胞凋亡及存活靶基因,减少凋亡,保护心肌细胞,而且可以磷酸化FoxO蛋白亚型,降低其转录活性,间接抑制细胞凋亡^[34-35]。mTOR作为PI3K/AKT通路下游重要调控分子,是该通路的能量代谢控制中心,在维持心血管稳态调节方面发挥重要作用,PI3K/AKT/mTOR通路的激活能够减轻细胞凋亡,缓解心肌缺血再灌注大鼠的心肌细胞损伤^[36-37]。此外,HIF-1信号通路亦介导冠心病的发生发展,其成员HIF-1 α 作用尤为显著。当心肌缺血缺氧时,HIF-1 α 可结合血管内皮生长因子(VEGF),促进新生血管形成,改善心肌血供;同时上调VEGF表达,调节血氧利用,提高心脏对缺氧的耐受^[38]。

最后, 本研究对小分子化合物环 (*L*-酪氨酸基-*L*-苯丙氨酸基)、7-羟基香豆素进行分子对接验证, 结果表明二者与冠心病相关靶蛋白 AKT1、STAT3、VEGFA 存在较强的结合作用, 结合能均小于-6 kcal/mol。研究表明^[39], 结合能越低, 其构象越稳定, 结合能 ≤ -5.0 kcal/mol 则说明有较好的结合活性。由此可见, 7-羟基香豆素、*L*-酪氨酸基-*L*-苯丙氨酸基亦均是潜在的有活性的化合物小分子。

4 结论

本研究采用网络药理学及分子对接方法对桑椹防治肝肾阴虚型 CHD 成分与作用机制进行系统的验证与探讨。结果表明桑椹对肝肾阴虚型 CHD 的防治作用涉及多个成分、靶点及通路, 并进一步调控机体炎症、凋亡反应以及血液循环。此外, 本研究还预测出环 (*L*-酪氨酸基-*L*-苯丙氨酸基) 和 7-羟基香豆素对于肝肾阴虚型 CHD 具有较显著的防治作用, 分子对接结果亦显示二者与冠心病相关靶蛋白结合度较好, 是潜在的有活性的化合物小分子, 值得考虑对其进行进一步的实验研究。

参考文献:

- [1] 徐文华, 郑景辉, 赵阳, 等. 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[J]. 中草药, 2019, 50(5): 1131-1140.
XU W H, ZHENG J H, ZHAO Y, et al. Molecular biological mechanism of tanshinone II A in treatment of coronary heart disease based on network pharmacology and bioinformatics[J]. Chin Tradit Herbal Drugs, 2019, 50(5): 1131-1140.
- [2] MATHERS C D, LONCER D. Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030[J]. PLoS Med, 2006, 3(11): e442.
- [3] 马丽媛, 吴亚哲, 陈伟伟. 《中国心血管病报告 2018》要点介绍[J]. 中华高血压杂志, 2019, 27(8): 712-716.
MA L Y, WU Y Z, CHEN W W. Introduction to the main points of "China Cardiovascular Disease Report 2018"[J]. Chin J Hypert, 2019, 27(8): 712-716.
- [4] 姚桢. 药食同源 预防保健-健康补品中的应用与研究动向[J]. 日本医学介绍, 2004, (11): 520-522.
YAO Z. Medicinal and edible food, preventive health care-the application and research trends of health supplements[J]. Prog Japanese Med, 2004, (11): 520-522.
- [5] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015.
- [6] 苏敬. 新修本草[M]. 上海: 上海卫生出版社, 1957.
SU J. Annotation of Materia Medica[M]. Shanghai: Shanghai Medical Press, 1957.
- [7] 周守忠. 养生类纂[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2018.
ZHOU S Z. Yangsheng Leizuan[M]. Beijing: Chinese medicine press, 2018.
- [8] SHRIKANTA A, KUMAR A, GOVINDASWAMY V. Resveratrol content and antioxidant properties of underutilized fruits[J]. J Food Sci Technol, 2015, 52(1): 383-390.
- [9] YUAN Q, ZHAO L. The mulberry (*Morus alba* L.) fruit-a review of characteristic components and health benefits[J]. J Agric Food Chem, 2017, 65(48): 10383-10394.
- [10] CHOI J W, SYNYSYA A, CAPEK P, et al. Structural analysis and anti-obesity effect of a pectic polysaccharide isolated from Korean mulberry fruit *Oddi* (*Morus alba* L.)[J]. Carbohydr Polym, 2016, 146: 187-196.
- [11] PARK S W, SHIN K C, YOOU S K, et al. Effects of an ethanolic extract of mulberry fruit on blood pressure and vascular remodeling in spontaneous hypertensive rats[J]. Clin Exp Hypertens, 2019, 41(3): 280-286.
- [12] LIU L K, LEE H J, SHIH Y W, et al. Mulberry anthocyanin extracts inhibit LDL oxidation and macrophage-derived foam cell formation induced by oxidative LDL[J]. J Food Sci, 2008, 73(6): H113-H121.
- [13] ZHOU Z, CHEN B, CHEN S, et al. Applications of network pharmacology in traditional chinese medicine research[J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2020, 2(14), 2020:1646905.
- [14] 郑筱萸. 中药新药临床研究指导原则[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2002.
ZHENG X Y. Guiding principles for clinical research of new Chinese medicines[M]. Beijing: China Medical Science and Technology Press, 2002.
- [15] 姜丽红, 魏岩. 冠心病从脾论治剖析[J]. 辽宁中医杂志, 2019, (10): 2073-2076.
JIANG L H, WEI Y. Analysis on treatment of coronary heart disease from spleen[J]. Liaoning J Tradit Chin Med, 2019, (10): 2073-2076.
- [16] 翟广玉, 颜子童, 渠文涛, 等. 槲皮素——有益于健康的天然化合物[J]. 食品研究与开发, 2015, (7): 118-122.
ZHAI G Y, YAN Z T, QU W T, et al. Natural health foods: Quercetin[J]. Food Res Dev, 2015, (7): 118-122.
- [17] DONG L Y, CHEN F, XU M, et al. Quercetin attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury via downregulation of the HMGB1-TLR4-NF- κ B signaling pathway[J]. Am J Transl Res, 2018, 10(5): 1273-1283.
- [18] 赵立敏, 王琦, 张勇. β -蜕皮甾酮应用于心血管疾病的研究进展[J]. 世界中医药, 2020, (23): 3599-3603.

- ZHAO L M, WANG Q, ZHANG Y. Research progress of β -ecdysterone in cardiovascular diseases[J]. *World Chin Med*, 2020, (23): 3599-3603.
- [19] 张春娥, 张惠, 刘楚怡, 等. 亚油酸的研究进展[J]. *粮油加工*, 2010, (5): 18-21.
 ZHANG C E, ZHANG H, LIU C Y, et al. Research progress of linoleic acid[J]. *Cere Oil Proc*, 2010, (5): 18-21.
- [20] FARVID M S, DING M, PAN A, et al. Dietary linoleic acid and risk of coronary heart disease: a systematic review and meta-analysis of prospective cohort studies[J]. *Circulation*, 2015, 132(3): e23-4.
- [21] 张雅雯, 邵东燕, 师俊玲, 等. 山奈酚生物功能研究进展[J]. *生命科学*, 2017, (4): 400-405.
 ZHANG Y W, SHAO D Y, SHI J L, et al. A review on biological activities of kaempferol[J]. *Chin Bull Life Sci*, 2017, (4): 400-405.
- [22] 杨丹, 樊迪, 杨政, 等. STAT3 与心血管疾病的研究进展[J]. *中华心血管病杂志*, 2020, (7): 616-620.
 YANG D, FAN D, YANG Z, et al. Research progress on the role of STAT3 in cardiovascular diseases[J]. *Chin J Cardiovas Dis*, 2020, (7): 616-620.
- [23] GHARAVI N M, ALVA J A, MOUILLESSEAU K P, et al. Role of the Jak/STAT pathway in the regulation of interleukin-8 transcription by oxidized phospholipids in vitro and in atherosclerosis in vivo[J]. *J Biol Chem*, 2007, 282(43): 31460-31468.
- [24] 梁燕盆, 马捷. 阻断 JAK/STAT 通道对大鼠缺血再灌注心肌细胞凋亡及 Bcl-2/Bax 表达的影响[J]. *中国药物与临床*, 2010, 10(4): 424-425.
 LIANG Y P, MA J. The effect of blocking JAK/STAT channel on myocardial cell apoptosis and Bcl-2/Bax expression after ischemia-reperfusion in rats[J]. *Chin J Med Ther*, 2010, 10 (4): 424-425.
- [25] ZHAO T, ZHAO W, CHEN Y, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF)-A: a role on cardiac angiogenesis following myocardial infarction[J]. *Microvasc Res*, 2010, 80(2): 188-194.
- [26] KIKUCHI R, STEVENS M, HARADA K, et al. Anti-angiogenic isoform of vascular endothelial growth factor-A in cardiovascular and renal disease[J]. *Adv Clin Chem*, 2019, 88: 1-33.
- [27] YLÄ-HERTTUALA S, RISSANEN T T, VAJANTO I, et al. Vascular endothelial growth factors: biology and current status of clinical applications in cardiovascular medicine[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2007, 49(10): 1015-1026.
- [28] NIU J, HAN X, QI H, et al. Correlation between vascular endothelial growth factor and long-term prognosis in patients with acute myocardial infarction[J]. *Exp Ther Med*, 2016, 12(1): 475-479.
- [29] ABEYRATHNA P, SU Y. The critical role of Akt in cardiovascular function[J]. *Vascul Pharmacol*, 2015, 74: 38-48.
- [30] 陈凡, 叶俊梅, 张玉彬. Akt 在心血管疾病中的调控作用[J]. *药学研究*, 2018, (5): 291-297.
 CHEN F, YE J M, ZHANG Y B. Regulation of Akt in cardiovascular diseases[J]. *Pharm Res*, 2018, (5): 291-297.
- [31] 李志强, 郑兴. 炎症与冠心病[J]. *中国心血管病研究杂志*, 2006, 4(3): 233-235.
 LI Z Q, ZHENG X. Inflammation and coronary heart disease[J]. *Chin J Cardiovascul Rev*, 2006, 4(3): 233-235.
- [32] 周平, 罗云, 邢娜, 等. 肿瘤坏死因子 α 介导动脉粥样硬化发生机制的研究进展[J]. *世界中医药*, 2015, (8): 1163-1168.
 ZHOU P, LUO Y, XING N, et al. Research progress of pathogenesis of atherosclerosis induced by tumor necrosis factor α [J]. *World Chin Med*, 2015, (8): 1163-1168.
- [33] 王玉珏, 柳思源, 陈瑜, 等. NOD 样受体蛋白 3 在动脉粥样硬化血管损伤中的作用及中医药干预相关进展[J]. *中西医结合心脑血管病杂志*, 2021, (3): 442-445.
 WANG Y J, LIU S Y, CHEN Y, et al. The Role of NOD-like Receptor Protein 3 in Atherosclerotic Vascular Injury and Related Progress of Traditional Chinese Medicine Intervention[J]. *Chin J Integr Med Cardio-Cerebrovascular Dis*, 2021, (3): 442-445.
- [34] 董艳, 刘咏梅, 王阶. 冠心病相关细胞凋亡及中药抗凋亡机制的研究进展[J]. *中西医结合心脑血管病杂志*, 2020, (14): 2242-2247.
 DONG Y, LIU Y M, WANG J. Research progress on coronary heart disease related cell apoptosis and anti-apoptotic mechanism of chinese medicine[J]. *Chin J Integr Med Cardio-Cerebrovascular Dis*, 2020, (14): 2242-2247.
- [35] RAPHAEL J, ABEDAT S, RIVO J, et al. Volatile anesthetic preconditioning attenuates myocardial apoptosis in rabbits after regional ischemia and reperfusion via Akt signaling and modulation of Bcl-2 family proteins[J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2006, 318(1): 186-94.
- [36] 李悦, 李梦杰, 张蕾, 等. PI3K/Akt/mTOR 信号通路稳态与心血管疾病的研究进展[J]. *医学综述*, 2020, (23): 4604-4611.
 LI Y, LI M J, ZHANG L, et al. Research progress of PI3K/Akt/mTOR signal pathway homeostasis and cardiovascular disease[J]. *Med Recapitul*, 2020, (23): 4604-4611.
- [37] CHI Y, MA Q, DING X Q, et al. Research on protective mechanism of ibuprofen in myocardial ischemia-reperfusion injury in rats through the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2019, 23(10): 4465-4473.
- [38] 许蕾, 杨光路. HIF-1 与疾病相关性研究进展[J]. *世界最新医学信息文摘*, 2019, 19(42): 91-92.
 XU L, YANG G L. Research progress on the relationship between HIF-1 and diseases[J]. *World Latest Med Inform Abstract*, 2019, 19(42): 91-92.
- [39] 宗阳, 丁美林, 贾可可, 等. 基于网络药理学和分子对接法探寻达原饮治疗新型冠状病毒肺炎(COVID-19)活性化合物的研究[J]. *中草药*, 2020, (4): 836-844.
 ZONG Y, DING M L, JIA K K, et al. Exploring active compounds of Da-Yuan-Yin in treatment of COVID-19 based on network pharmacology and molecular docking method[J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2020, 51(4): 836-844.

备注: 本文的彩色图表可从本刊官网 (<http://lyspkj.ijournal.cn>)、中国知网、万方、维普、超星等数据库下载获取。☉