

# 基于网络药理学及分子对接技术探讨牛黄降压胶囊抗高血压的有效成分及作用机制

温孟昊 孙业凯 张子柔 闫庆国 王芳芳\*

临沂大学 山东临沂 276000

**摘要:**目的 基于网络药理学方法研究牛黄降压胶囊抗高血压的具体作用机制,为临床上的有效应用提供支撑。方法 应用中药系统药理学数据库与分析平台(TCMSP),确定牛黄降压胶囊中各种主要成分对应的活性成分,通过SwissADME平台预测活性成分的对靶点蛋白。然后,利用Genecards数据库搜寻疾病高血压的疾病靶点,再利用韦恩图构建交集部分。应用Cytoscape软件建立中药、活性成分、靶点和疾病网络关系图。应用STRING数据库构建蛋白-蛋白互作(PPI)图,基于GO数据库和KEGG通路数据库,确定核心成分-关键靶标-主要通路多维网络,进而探索牛黄降压胶囊治疗高血压的可能机制。结果 获得牛黄降压胶囊活性成分93个,靶点159个,高血压靶点1664个,交集靶点75个,KEGG通路富集在癌症通路、化学致癌-受体激活通路、PI3K-Akt信号通路、以及内分泌抗药性通路等,分子对接结果显示木犀草素与丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶AKT(AKT1),环氧合酶-2(PTGS2)等靶点结合较好。结论 牛黄降压胶囊主要通过活性成分木犀草素等活性成分,介导AKT1、PTGS2等重要靶点,调控癌症通路、化学致癌-受体激活通路、PI3K-Akt信号通路等,发挥降血压的功效。

**关键词:**牛黄降压胶囊;网络药理学;分子对接;高血压

高血压是脑卒中、冠心病的危险因素,也是世界范围内导致死亡的主要原因之一<sup>[1]</sup>。研究发现高血压是一种多基因遗传病,是遗传因素和环境因素共同作用的结果,其发病机制至今尚未完全明确。多认为是因外周小动脉壁平滑肌张力升高及其对血管活性物质反应小增加,导致血管发生结构性变化引起外周血管阻力增加所致<sup>[2-3]</sup>。另外,有研究认为,高血压的发生、发展与动脉血压调节因素息息相关,但仅作为危险因素<sup>[4-5]</sup>。因此,高血压预防治疗成为我国普遍关注的问题,在高血压预防治疗方面,现代抗高血压药物研发从20世纪中叶开始起步,并随着现代生理学与药学的进展,进入高速发展时期,但进入21世纪后,传统抗高血压药物的发展大幅度放慢。这主要是由于西药研发成本较高,同时会对人体产生一定的毒副作用<sup>[6]</sup>。而中药因其药性和缓、药物疗效时间较长、不容易诱发不良反应等优点得到广泛应用<sup>[7]</sup>。

中药作为中国传统医药对我国人民的医疗保健起着十分重要的作用。对于复杂的慢性疾病,中药疗效较好同时副

作用较低,从中草药中寻找潜在候选药物很可能会提高药物发现速率和效率<sup>[8-9]</sup>。中药是根据中医理论,组合了多种植物、动物、矿物,进而构成基于整体的多组分天然药物,以中医理论为基础,具有其独特的理论体系与应用形式。但是,中医药通常以抽象概念来描述医药理论和治疗原则,所以长期以来很难和现代科学医药理论接轨,也不容易被人们所接纳。正因为如此,虽然中药理论具有很大的潜力来防治人类疾病,但是,由于没有的现代科学理论作为指导以及科学的语言描述,使其未能得到充分发展<sup>[10]</sup>。现在,随着新技术的不断涌现,在治疗人类疾病,例如癌症、糖尿病和心脑血管疾病等方面,中药发挥着越来越重要的作用。近年来,学科间的交叉异常活跃,计算科学、化学、医学和统计生物学等进行了有机结合,利用计算模拟、建模和计算药理学来预测中医药药理学性质逐渐被众多学者提出<sup>[11-13]</sup>。

在药物发现过程中,关键的步骤是筛选活性分子。在传统药物设计过程中,始终遵循着“一个基因,一个药物,一个靶标”的原则,但是,从疾病的角度来看,很多复杂的疾病,

如癌症、心血管疾病、代谢疾病等都是由多种基因功能上的缺陷导致的,并不是由单一基因所致,因此,这类疾病如果通过药物干预其中一个靶点往往不能起到很好的治疗效果。而在中医治疗过程中,中医症候和生物网络具有一定的关联性。研究人员通过研究基因-靶点-药物之间的相互作用而形成了一个新的概念:网络药理学,它利用专业网络分析软件,得到疾病-疾病、靶点-药物、药物-药物之间的关联,从网络的角度分析药物对疾病的影响,从而解读药物机理。因此,通过网络药理学探讨中药的作用机理来实现中药的现代化研究,可能是实现中药走向现代化和国际化新途径<sup>[15]</sup>。

牛黄降压方式降压是经典古方,包括羚羊角、珍珠、水牛角浓缩粉、人工牛黄、冰片、白芍、党参、黄芪、决明子、川穹、黄芩提取物、甘松、薄荷、郁金等中药组成。现在,临床应用的牛黄降压制剂包括丸剂、片剂和胶囊剂。其中对牛黄降压丸的临床报道较多<sup>[16-17]</sup>。研究表明其除了具有镇静、降压、利尿等作用外,临床上还可有效改善心功能,通过增加心输出量和脉搏输出量,降低心肌耗氧量、改善心肌的供血供氧,同时扩张外周血管,降低外周阻力,调整心血管的顺应性,对心血管系统起到调整和改善作用<sup>[18,19]</sup>。而对牛黄降压胶囊的临床报道相对较少,实验研究则更少。因此,对于牛黄降压胶囊的药理学研究是一个重要的课题,并且从分子水平上阐述其抗高血压的作用机制也是现代药学研究的一个热点。

因此,本课题利用网络药理学联合分子对接方法对牛黄降压胶囊进行药理学研究,为牛黄降压胶囊的临床应用提供理论基础,为作为高血压改善治疗的新食品资源的开发提供新的依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 数据库简介

本研究应用的数据库主要有中药系统药理学数据库与分析平台(traditional Chinese medicine systems pharmacology database and analysis platform, TCMSP, <http://tcmspw.com/tcmsp.php>),该平台包括4大数据库:中药方剂数据库、中药材数据库、中药成分数据库、疾病/症状靶标数据库。其中中药方剂数据库收录了4052种中成药,信息涵盖方剂名称、剂型、服用方法、方剂功效、治疗中医疾病名称、方剂组成等信息;中药材数据库收录了400余味常用中药材,包

括中文名称、拉丁名称、性味归经、基原、产地、采集期、功效等信息;中药成分数据库收录了1.3万余个化学成分信息,包括成分名称、CAS号、中文名称、英文名称、分子式、相对分子质量、理化性质、药物代谢性质、药理作用等;疾病/症状靶标数据库整合了Drugbank(<https://www.drugbank.ca/>)、OMIM(<http://www.omin.org/>)、HPO(<http://human-phe-notype-ontology.github.io/>)、TTD(<http://bidd.nus.edu.sg/group/cjttd/>)、京都基因与基因组百科全书(KEGG, <http://www.kegg.jp/>)、基因本体(GO)数据库(<http://www.geneontology.org>)等数据库资源。SwissADME工具(<http://www.swissadme.ch>)是一个免费的网络工具,可以访问一个快速而强大的物理化学性质、药代动力学、药物相似性和药物化学的预测模型池。GeneCards数据库(<https://www.genecards.org/>)作为一个可搜索基因的综合数据库,可以获得到几乎所有的已知的人类基因信息,该数据库自动整合来自约150个以基因为中心的数据库的资源,包括基因组学、转录组学、蛋白质组学、遗传学、临床和功能等多方面的信息。STRING数据库(<https://cn.string-db.org/>),是一个基于公共数据库和文献信息的蛋白质相互作用网络数据库,它整合UniProt、KEGG、NCBI和Gene Ontology等数据库,从而生成的蛋白质相互作用网络数据库。

### 1.2 化学成分的搜集

在TCMIP中建立任务列表,在“中药信息”项中添加羚羊角,珍珠,牛黄,冰片,党参,黄芪,决明子,黄芪,甘松,薄荷,郁金11味药材,搜集中药成分数据库中的相关化学成分,建立牛黄降压胶囊的化学成分数据库。另外,以生物利用度OB值 $\geq 30\%$ ,类药性DL $\geq 0.18$ 作为进一步的筛选条件,得到牛黄降压胶囊的主要活性成分。然后,应用SwissADME数据库进一步筛选有效成分,筛选条件如下:胃肠道吸收(GI adsorption)显示“high”,类药性在(druglike\_ness)至少2个“Yes”。

### 1.3 牛黄降压胶囊有效成分靶点的搜集

在SwissADME数据库中,利用“Swiss TargetPrediction”模块对1.2中筛选出的有效成分对应的靶点进行筛选,取“probability” $>0.1$ 作为进一步筛选条件,获得牛黄降压胶囊有效成分作用的具体靶点信息。

### 1.4 疾病基因靶标的搜集

进入GeneCards数据库,以关键词“hypertension”作

为关键词进行检索,收集高血压的已知治疗靶标。所得结果根据“Scores”作为筛选条件。同时,使用 OMIM 数据库、DisGeNET 数据库补充筛选疾病靶点。综合以上三个数据库信息得到高血压相关的靶点。

### 1.5 药物与疾病共有靶标的预测

为了进一步探索牛黄降压胶囊与高血压之间的具体关系,应用 Venny2.1 软件,绘制牛黄降压胶囊有效成分靶点与高血压疾病靶点的韦恩图,获得交集靶点。

### 1.6 成分靶标-疾病靶标网络构建与关键靶标筛选

进入 STRING 数据库,选择“Multiple Proteins”,将成分和疾病共有的靶点导入,物种选择“Homo sapiens”,搜索获得牛黄降压胶囊抗高血压的潜在靶标间的相互关系。利用 Cytoscape 软件中的“Centiscape 2.2”进行核心靶点筛选(参数应用 Betweenness, Closeness, 和 Degree),再应用 Network Analyzer 工具进行网络分析,通过设置节点大小和颜色反映 Degree(在网络中通过这个点连接的边的个数),并设置边的粗细体现结合分数的大小,从而获得靶点蛋白可视化互作网络图。

### 1.7 基因功能和通路富集分析

本研究主要利用 David 数据库(<https://david.ncifcrf.gov/summary.jsp>)进行基因本体论功能富集分析(Gene Ontology, GO)和信号通路富集分析(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG),综合预测牛黄降压胶囊与高血压靶点的生物学作用及具体调控通路。

### 1.8 重要靶点与主要活性成分的分子对接

通过 RCSB 蛋白质数据库(<https://www.rcsb.org/>)获得重要蛋白晶体结构,牛黄降压胶囊的主要活性成分从 PubChem 数据库中获得,然后,应用 AutoDock 软件<sup>[20]</sup>进行分子对接。分子对接前,首先从蛋白质中除去共结晶配体以及水分子和离子等杂原子。极性氢原子和 Gasteiger 电荷被加到受体上。另外,针对配体分子主要做如下处理:加非极性氢和 Gasteiger 电荷,定义可旋转键,并指定 AutoDock 类型。

使用 AutoGrid 算法生成具有  $60 \times 60 \times 60 \text{ \AA}$  网格点且网格间距为  $0.375 \text{ \AA}$  的 3D 网格盒来评估配体-受体相互作用能量<sup>[21]</sup>。此外,应用拉马克算法(LGA)方法来搜索全局优化的构象。最后,选择结合自由能较低的结合模式进行深入分析。

## 2 结果

### 2.1 牛黄降压胶囊活性成分信息

通过 TCMS 数据库平台,查找得到牛黄降压胶囊的所有化学成分。以  $OB \geq 30\%$ ,  $DL \geq 0.18$  为筛选条件过滤,共得到牛黄降压胶囊的活性成分 149 个,其中牛黄 5 个、冰片 3 个、白芍 13 个、党参 21 个、黄芪 20 个、决明子 14 个、川芎 7 个、黄芩 36 个、甘松 5 个、薄荷 10 个、郁金 15 个。再经过 SwissADME 数据库进一步筛选得到有效成分 83 个,其中牛黄 4 个、冰片 2 个、白芍 7 个、党参 8 个、黄芪 13 个、决明子 9 个、川芎 3 个、黄芩 29 个、甘松 2 个、薄荷 4 个、郁金 12 个,有效成分结果见表 1。

表 1 牛黄降压胶囊的有效化学成分

分子名称	OB (%)	DL
methyl (4R)-4-[(3R,5S,7S,8R,9S,10S,12S,13R,14S,17R)-3,7,12-trihydroxy-10,13-dimethyl-2,3,4,5,6,7,8,9,11,12,14,15,16,17-tetradecahydro-1H-cyclopenta[a]phenanthren-17-yl]pentanoate	32.31767	0.76385
Methyl desoxycholate	34.63459	0.72997
Deoxycholic Acid	40.72302	0.68353
ZINC01280365	46.37565	0.49148
asiatic acid	41.38281	0.71097
bronyl acetate	59.29526	0.51159
11alpha,12alpha-epoxy-3beta-23-dihydroxy-30-norolean-20-en-28,12beta-olide	64.77389	0.37586
paeoniflogrenone	87.59312	0.36678
(3S,5R,8R,9R,10S,14S)-3,17-dihydroxy-4,4,8,10,14-pentamethyl-2,3,5,6,7,9-hexahydro-1H-cyclopenta[a]phenanthrene-15,16-dione	43.5562	0.53276
paeoniflorin_qt	68.17576	0.39507
albiflorin_qt	66.64077	0.32626

kaempferol	41.88225	0.24066
(+)-catechin	54.82643	0.24164
Perlolyrine	65.94775	0.2747
7-Methoxy-2-methyl isoflavone	42.56474	0.19946
Frutinone A	65.90373	0.34184
luteolin	36.16263	0.24552
3-beta-Hydroxymethylenetanshiquinone	32.16103	0.40894
Daturilin	50.36513	0.76801
glycitein	50.47891	0.23826
11-Hydroxyrankinidine	40.00276	0.66203
Jaranol	50.82882	0.29148
isorhamnetin	49.60438	0.306
3,9-di-O-methylnissofin	53.74153	0.47573
7-O-methylisomucronulatol	74.68614	0.29792
9,10-dimethoxypterocarpan-3-O-β-D-glucoside	36.73669	0.9243
(6aR,11aR)-9,10-dimethoxy-6a,11a-dihydro-6H-benzofurano[3,2-c]chromen-3-ol	64.25545	0.42486
Bifendate	31.09782	0.66553
formononetin	69.67388	0.21202
isoflavanone	109.9867	0.29572
Calycosin	47.75183	0.24278
(3R)-3-(2-hydroxy-3,4-dimethoxyphenyl)chroman-7-ol	67.66748	0.26479
1,7-Dihydroxy-3,9-dimethoxy pterocarpene	39.04541	0.47943
quercetin	46.43335	0.27525
rhein	47.06521	0.27678
Toralactone	46.46436	0.23965
aloe-emodin	83.37964	0.2409
Rubrofusarin	45.55227	0.23932
Aurantio-obtusin	31.54787	0.36996
Obtusin	81.43104	0.40459
9,10-dihydroxy-7-methoxy-3-methylene-4H-benzof[3,2-c]isochromen-1-one	63.25138	0.24007
obtusin	31.23561	0.40403
Quinizarin	47.3391	0.18621
Myricanone	40.59757	0.51262
senkyunone	47.66395	0.24435
wallichilide	42.31068	0.70639

acacetin	34.97357	0.24082
wogonin	30.68457	0.22942
(2R)-7-hydroxy-5-methoxy-2-phenylchroman-4-one	55.23317	0.20163
baicalein	33.51892	0.20888
5,8,2' -Trihydroxy-7-methoxyflavone	37.00837	0.26546
5,7,2,5-tetrahydroxy-8,6-dimethoxyflavone	33.81583	0.44739
Carthamidin	41.15096	0.24189
2,6,2' ,4' -tetrahydroxy-6' -methoxychaleone	69.03988	0.21994
Dihydrobaicalin_qt	40.03778	0.20722
Eriodyctiol (flavanone)	41.35043	0.2436
Salvigenin	49.06593	0.33279
5,2' ,6' -Trihydroxy-7,8-dimethoxyflavone	45.04743	0.33057
5,7,2' ,6' -Tetrahydroxyflavone	37.01349	0.24382
dihydrooroxylin A	38.71507	0.22987
Skulleapflavone II	69.51043	0.4379
oroxylin a	41.36757	0.23233
Panicolin	76.25705	0.2915
5,7,4' -Trihydroxy-8-methoxyflavone	36.562	0.26666
NEOBAICALEIN	104.3446	0.43917
DIHYDROOROXYLIN	66.06174	0.23057
Norwogonin	39.40397	0.20723
5,2' -Dihydroxy-6,7,8-trimethoxyflavone	31.71246	0.35462
ent-Epicatechin	48.95984	0.24162
coptisine	30.67185	0.85647
epiberberine	43.09233	0.7761
Moslosooflavone	44.08796	0.25331
5,7,4' -trihydroxy-6-methoxyflavanone	36.62689	0.26833
5,7,4' -trihydroxy-8-methoxyflavanone	74.23522	0.26479
rivularin	37.94023	0.3663
(2R)-5,7-dihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)chroman-4-one	42.36332	0.21141
cryptotanshinone	52.34196	0.39555
Diosmetin	31.13795	0.27442
naringenin	59.2939	0.21128
eriodietylol	71.79265	0.24372
Genkwanin	37.13043	0.23696

curcolactone	51.50982	0.19615
(4aR,5R,8R,8aR)-5,8-dihydroxy-3,5,8a-trimethyl-6,7,8,9-tetrahydro-4aH-benzof[f]benzofuran-4-one	59.5196	0.19518
Curcumenolactone C	39.70087	0.18868
(E)-1,7-Diphenyl-3-hydroxy-1-hepten-5-one	64.66064	0.18319
(E)-5-Hydroxy-7-(4-hydroxyphenyl)-1-phenyl-1-heptene	46.89753	0.19423
Oxycurcumenol	67.06408	0.18343
Zedoalactone A	111.4269	0.18825
Zedoalactone B	103.5929	0.21754
zedoalactone E	85.16477	0.19062
Zedoarolide A	87.96502	0.29704
Zedoarolide B	135.5564	0.21409
1,7-Diphenyl-3-acetoxy-6(E)-hepten	48.47078	0.22242

## 2.2 药物 - 疾病靶点筛选

对以上筛选得到的 93 个化合物进行潜在靶点分析，共发现 666 个潜在靶点，

牛黄 33 个、冰片 4 个、白芍 99 个、党参 97 个、黄芪 188 个、决明子 3 个、川芎 1 个、黄芩 158 个、甘松 17 个、薄荷 66 个，删除重复靶点后获得牛黄降压胶囊对应的潜在靶点 159 个。另外，利用 GeneCards 数据库，OMIM 数据库，DisGeNET 数据库对疾病高血压对应的靶点进行筛选，共获得 1664 个高血压靶点。同时，将疾病靶点与牛黄降压胶囊对应的 159 个潜在靶点进行对比，通过绘制牛黄降压胶囊 - 高血压靶点韦恩图（图 1A），得到共有靶点 75 个，具体信息见表 2。

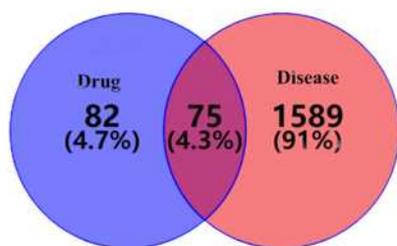


图 1 牛黄降压胶囊与高血压靶点的韦恩图

表 2 牛黄降压胶囊治疗高血压的潜在靶点

序号	基因	序号	基因	序号	基因
1	CA2	26	ADORA1	51	AKT1
2	CA1	27	MAOA	52	APP
3	NR1H4	28	GSK3B	53	ESR1
4	VDR	29	MMP9	54	PTGS2
5	AR	30	MMP2	55	CFTR
6	HSD11B1	31	ALOX15	56	GRK6
7	SERPINA6	32	ALOX12	57	TERT
8	SHBG	33	ADORA2A	58	INSR
9	G6PD	34	ARG1	59	MYLK
10	GABBR1	35	GPR35	60	PIK3CG
11	CYP19A1	36	ESR2	61	IL2
12	PPARA	37	SLC22A12	62	FTO
13	PGR	38	TTR	63	ELANE
14	CYP17A1	39	EGFR	64	NOS2
15	NR3C1	40	AVPR2	65	MAOB
16	SLC6A3	41	IGF1R	66	IKBKB
17	MAPK3	42	F2	67	KCNA3
18	PTPN1	43	MPO	68	PTGS1
19	NOX4	44	PIK3R1	69	KIT
20	XDH	45	SRC	70	HTR2B
21	ALOX5	46	PTK2	71	ADRA2C
22	ABCC1	47	KDR	72	ADRA2B
23	AHR	48	MMP3	73	CYP2D6
24	ABCB1	49	CA3	74	STAT3
25	CYP1B1	50	ALK	75	PLG

### 2.3 潜在核心靶点 PPI 蛋白互作网络

将牛黄降压胶囊和高血压疾病共有的靶点导入 STRING 数据库, 设置物种为“Homo sapiens”, 得到 PPI 蛋白互作网络, 包括 72 个节点, 539 条边 (图 2A)。另外, 应用 Cytoscape 软件中的“Centiscape 2.2”工具对网络进行进一步优化, 得到 12 个节点, 61 条边的蛋白互作网络, 见图 2B 和 2C, 根据度值 (degree) 进行排序, 依次是丝氨酸 / 苏氨酸蛋白激酶 AKT (AKT1), 雌激素受体  $\alpha$  (ESR1), 信号传导和转

录激活因子 3 (STAT3), 酪氨酸蛋白激酶 SRC (SRC), 环氧合酶 -2 (PTGS2), 表皮生长因子受体 (EGFR), MAP 激酶 ERK1 (MAPK3), 基质金属蛋白酶 9 (MMP9), 糖皮质激素受体 (NR3C1), 白细胞介素 -2 (IL2), 过氧化物酶体增殖物活化受体  $\alpha$  (PPARA), 细胞色素 P450 19A1 (CYP19A1)。以上这些靶点可能是牛黄降压胶囊治疗高血压的潜在关键靶点。

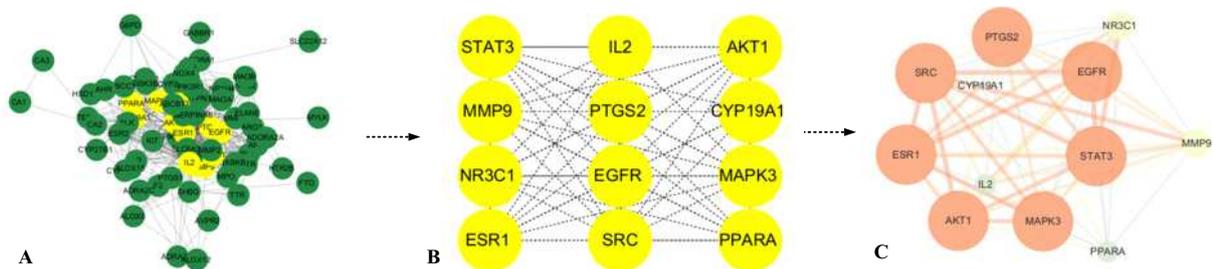


图 2 PPI 蛋白互作网络图

### 2.4 GO 功能与 KEGG 通路富集分析

将 75 个交集靶点导入 DAVID 数据库进行 GO 功能富集分析, 得到包括 BP (生物过程)、MF (分子功能) 和 CC (细胞组分) 共 320 条 GO 条目, 其中 BP 相关条目 205 条, 涉及磷酸化、RNA 聚合酶 II 启动子转录的正调控、信号转导、细胞凋亡的负调控、G 蛋白偶联受体信号通路、细胞增殖的负调控、对外来生物刺激的反应、基因表达的负调控、炎症反应、细胞增殖的正调控等, CC 相关条目 36 条, 涉及原生

质膜、细胞质、膜、细胞液、细胞外分泌体、细胞外液、胞外区、线粒体、细胞内膜结合细胞器、内质网膜等, MF 相关条目 79, P 值靠前的有蛋白结合、相同蛋白结合、ATP 结合、锌离子结合、酶结合、蛋白质同源二聚化活性、DNA 结合、RNA 聚合酶 II 转录因子活性配体激活序列特异性 DNA 结合、血红素结合、转录因子活性序列特异性 DNA 结合等。对 BP、CC 和 MF 前十条通路绘制的 GO 富集图见图 3。

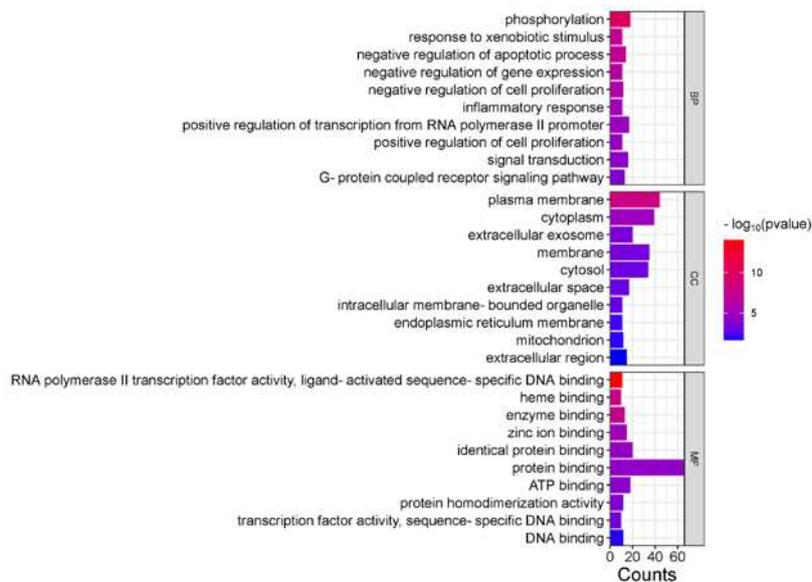


图 3 牛黄降压胶囊对高血压交集靶点的 GO 富集分析

同时,对交集基因进行KEGG富集分析,共得到97条 $P < 0.05$ ,我们选择前20条通路制作富集气泡图,见图4。富集结果从高到低分别是Pathways in cancer、Chemical carcinogenesis - receptor activation、PI3K-Akt signaling pathway、Endocrine resistance,结果表明基因主要富集到癌症通路、化学致癌-受体激活通路、PI3K-Akt信号通路、以及内分泌抗药性通路等。同时,研究发现,基因AKT1,

STAT3, PIK3R1, ESR1, EGFR, ESR2, MAPK3等关键靶点在癌症通路和化学致癌-受体激活通路都富集显著。另外,我们以癌症通路为主要对象,对通路蛋白对应的通路图进行分析,结果见图5。同时,根据药物-疾病靶点筛选结果、潜在核心靶点PPI蛋白互作网络结果、KEGG通路富集结果,我们选择排名前10的核心靶点进行后续分子对接研究。

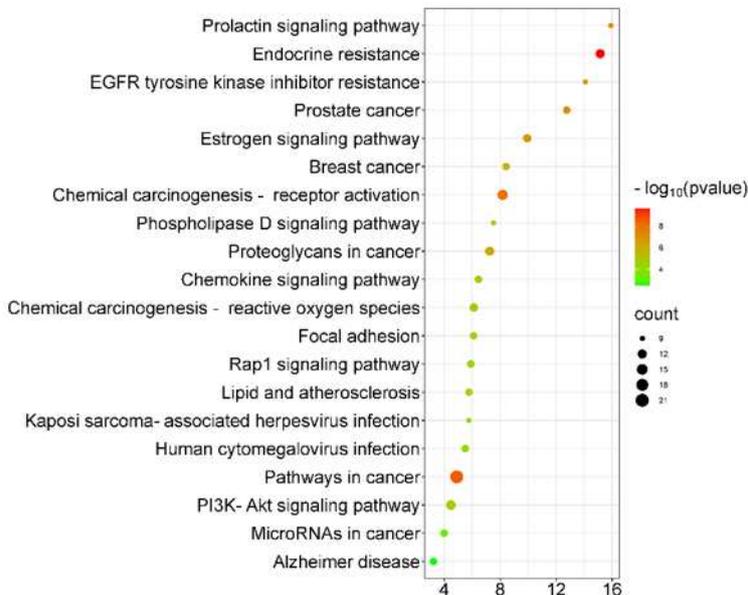


图4 KEGG通路的气泡图

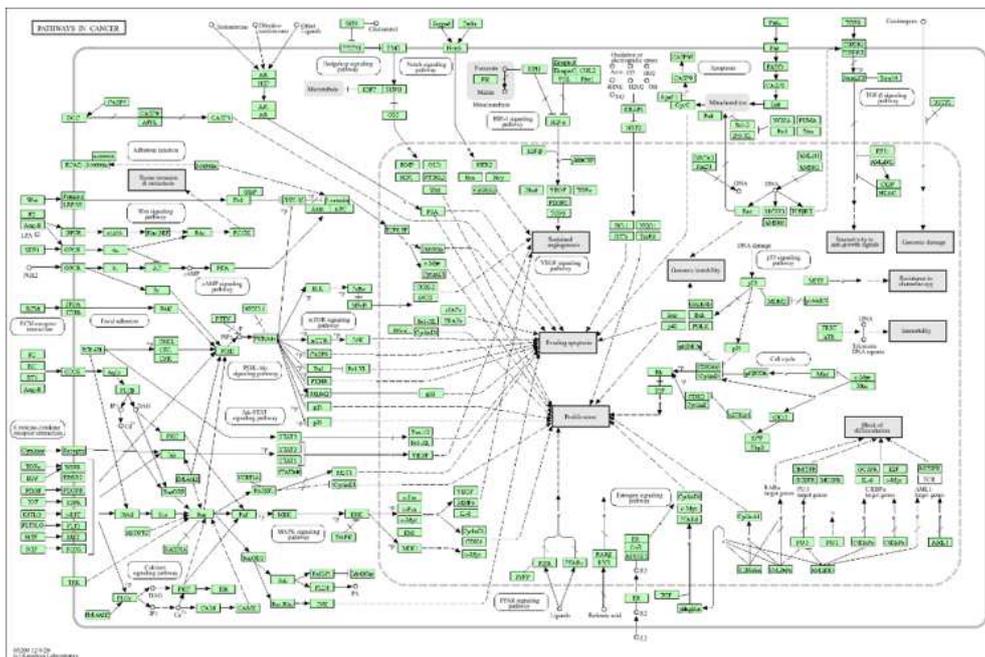


图5 癌症通路图

## 2.5 分子对接分析

应用分子对接技术对度值排名前 10 名的核心靶点与对应的活性成分之间的结合度进行研究。结果显示, 活性成分木犀草素、槲皮素、异鼠李素、山萘酚与靶点 AKT1 的结合能低于  $-9.0$  kcal/mol; 活性成分木犀草素、黄芩素、千层纸素 A、黄芩黄酮与靶点 PTGS2 的结合能低于  $-9.0$  kcal/mol, 结合力较强, 具体对接结果见表 3。

同时, 我们对这些活性成分与对应靶点进行具体结合模式分析, 对接结果显示, 山萘酚与氨基酸 Asn54, Gln79, Trp80, Ser205, Leu210, Thr211, Lys268, Val270, Val271, Tyr272, Ile290, Thr291, Asp292 形成相互作用 (图 6A), 同时, 与 Gln79 ( $2.18\text{\AA}$ ,  $147.6^\circ$ ), Ile290 ( $2.52\text{\AA}$ ,  $118.5^\circ$ ), 和 Ser205 ( $2.36\text{\AA}$ ,  $141.0^\circ$ ) 形成氢键 (图 6B); 木犀草素周围的氨基酸主要有 Asn54, Gln79, Trp80, Ser205, Leu210, Thr211, Val270, Val271, Tyr272, Arg273, Ile290, Thr291, Asp292 (图 6C), 并与 Ser205 ( $2.65\text{\AA}$ ,  $96.4^\circ$ ), Thr211 ( $2.73\text{\AA}$ ,  $117.8^\circ$ ), Val271 ( $2.92\text{\AA}$ ,  $87.8^\circ$ ) 形成氢键提高结合力 (图 6D)。异鼠李素周围  $4.5\text{\AA}$  以内的氨基酸残基主要有 Asn54, Gln79, Trp80, Ser205, Leu210, Thr211, Ala212, Met227, Lys268, Val270, Val271, Tyr272, Ile290, Thr291, Asp292 (图 6E), 并与氨基酸 Thr211 形成两个氢键 ( $2.35\text{\AA}$ ,  $148.8^\circ$ ), ( $2.32\text{\AA}$ ,  $131.2^\circ$ ) (图 6F)。而槲皮素主要与受体中的氨基酸 Asn54, Gln79, Trp80, Ser205, Leu210, Thr211, Ala212, Lys268, Val270, Val271, Tyr272, Ile290, Thr291, Asp292 形成配体-受体相互作用 (图 6G), 并与 Gln79 ( $2.04\text{\AA}$ ,  $144.4^\circ$ ), Thr211 ( $2.18\text{\AA}$ ,  $150.8^\circ$ ), Val271 ( $3.07\text{\AA}$ ,  $74.9^\circ$ ) 形成氢键 (图 6H)。

另外, 活性成分与受体 PTGS2 进行分子对接的结果见图 7。木犀草素在受体结合位点周围的氨基酸主要有 Cys36, His39, Cys47, Tyr130, Gly135, Tyr136, Leu152, Pro153, Gln461, Glu465, Tyr466, Lys468, Arg469 (图 7A), 并与 Tyr130 ( $2.10\text{\AA}$ ,  $147.4^\circ$ ), Glu465 ( $2.66\text{\AA}$ ,  $97.4^\circ$ ) 形成氢键 (图 7B)。黄芩素在受体结合部位主要与氨基酸残基 Cys36, His39, Arg44, Val46, Cys47, Tyr130, Gly135, Pro153, Gln461, Arg469 靠近 (图 7C), 并与氨基酸 Gly135 形成氢键 ( $2.83\text{\AA}$ ,  $94.9^\circ$ ) (图 7D)。千层纸素 A 与环氧合酶-2 的结合构象见图 7E, 我们发现千层纸素 A 周围的氨基酸主要有 Cys36, His39, Arg44, Gly45, Val46, Cys47, Met48, Tyr130, Gly135, Leu152, Pro153, Gln461, Lys468, Arg469, 同时, 与氨基酸 Cys47 ( $2.02\text{\AA}$ ,  $159.2^\circ$ ) 形成氢键相互作用 (图 7F)。黄芩黄酮主要与环氧合酶-2 配体结合部位的 Cys36, His39, Asn43, Arg44, Gly45, Val46, Cys47, Tyr130, Lys137, Pro153, Gln461, Lys468, Arg469 形成配体-受体相互作用, 并与氨基酸 His39 ( $2.10\text{\AA}$ ,  $166.1^\circ$ ), Tyr130 ( $2.25\text{\AA}$ ,  $130.2^\circ$ ), Gln461 ( $2.30\text{\AA}$ ,  $130.7^\circ$ ) 形成氢键, 从而增加两者的结合强度。

表 3 分子对接结果

中文名称	英文缩写	PDB	活性成分	结合能 (kcal/mol)
丝氨酸 / 苏氨酸蛋白激酶 AKT	AKT1	3O96	kaempferol	-9.3
			luteolin	-9.9
			isorhamnetin	-9.5
			quercetin	-9.7
环氧合酶-2	PTGS2	5IKR	luteolin	-9.3
			baicalein	-9.2
			oroxilin a	-9.1
			Panicolin	-9.1

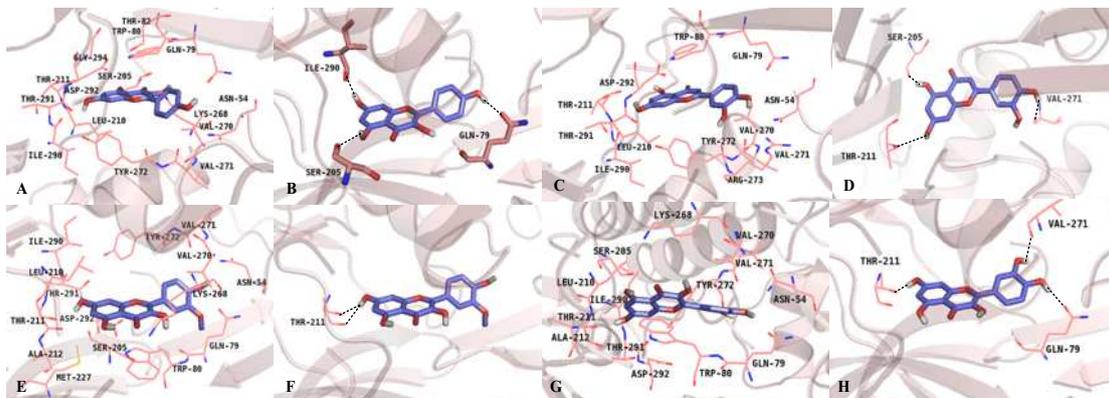


图 6. (A) 分子对接后山萘酚与丝氨酸 / 苏氨酸蛋白激酶 AKT 的结合构象; (B) 山萘酚与配体结合部位形成的氢键相互作用; (C) 分子对接后木犀草素与丝氨酸 / 苏氨酸蛋白激酶 AKT 的结合构象; (D) 木犀草素与配体结合部位形成的氢键相互作用; (E) 分子对接后

异鼠李素与丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 AKT 的结合构象; (F) 异鼠李素与配体结合部位形成的氢键相互作用; (G) 分子对接后槲皮素与丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 AKT 的结合构象; (H) 槲皮素与配体结合部位形成的氢键相互作用。配体以棍状模型显示, 氢键显示为黑色虚线, 为了清晰起见, 去除了非极性氢。

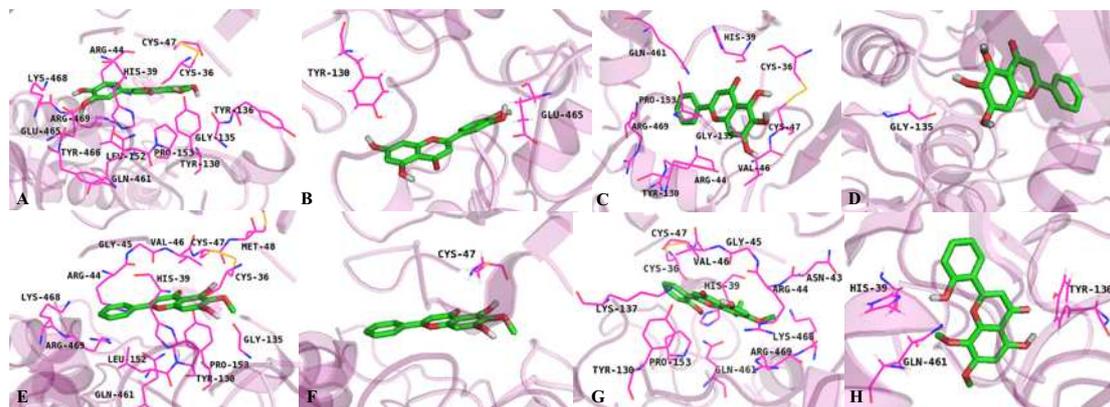


图 7. (A) 分子对接后木犀草素与环氧合酶-2 的结合构象; (B) 木犀草素与配体结合部位形成的氢键相互作用; (C) 分子对接后黄芩素与环氧合酶-2 的结合构象; (D) 黄芩素与配体结合部位形成的氢键相互作用; (E) 分子对接后千层纸素 A 与环氧合酶-2 的结合构象; (F) 千层纸素 A 与配体结合部位形成的氢键相互作用; (G) 分子对接后黄芩黄酮与环氧合酶-2 的结合构象; (H) 黄芩黄酮与配体结合部位形成的氢键相互作用。配体以棍状模型显示, 氢键显示为黑色虚线, 为了清晰起见, 去除了非极性氢。

### 3 讨论

近年来, 高血压患病率持续升高, 2010 年全球高血压患者达到 31.3%, 中低收入国家达到 31.5%<sup>[22]</sup>。在我国, 高血压的治疗和控制水平都低于发达国家, 预计 2025 年全球高血压患者将大于 15 亿<sup>[23]</sup>。而引发高血压的因素是多方面的, 包括遗传、环境、其他因素(年龄、性别、肥胖、药物、缺乏运动等)。目前, 针对高血压已经研发的药物有利尿剂、血管紧张素转换酶抑制剂、血管紧张素受体拮抗剂、 $\beta$ -受体阻滞剂、以及钙通道阻滞剂, 这些药物在降压方面能起到较好的效果, 但是会引起副作用, 例如继发性脏器损伤、依从性低、生活质量下降等。因此, 如何治疗高血压是临床亟待解决的关键问题。

牛黄降压胶囊由牛黄、白芍、薄荷、冰片、川穹、党参、甘松、黄芪、黄芩、决明子、郁金等 14 味中药组成。该味中药主要借鉴古方“安宫牛黄丸”立法之旨, 采用阴阳虚实、平衡之法从而研制出的经验方。该味中药以牛黄为主药, 起到清心解热, 开窍化痰之效; 郁金疏肝理气, 行气郁金; 冰片安神定惊, 散热解痛, 疏散肝火; 白芍柔肝止痛而平肝阳; 黄芪补中益气, 清心热泻肝火滋肝阴。研究显示, 该味中药降压效果确切, 并且具有调脂、抗血小板凝聚、抗衰等作用<sup>[24]</sup>。

本研究结合高血压的古今病因辩证, 应用网络药理学、分子对接技术对牛黄降压胶囊治疗高血压的机制进行阐述。首先, 将牛黄降压胶囊的有效活性成分和疾病高血压的靶点进行整合, 再通过 PPI 蛋白互作确定核心靶点, 接着进行基因功能和通路富集分析, 最后, 利用分子对接技术验证结果的准确性。

PPI 蛋白互作网络研究显示潜在的关键靶点有 AKT1, ESR1, STAT3, SRC, PTGS2, EGFR, MAPK3, MMP9, NR3C1, IL2, PPARA, CYP19A1。另外, 选取度值排名前 10 的核心靶点与其对应的有效活性成分进行对接, 应用对接进行进一步筛选, 结果显示, 靶点 AKT1 与活性成分木犀草素、槲皮素、异鼠李素、山萘酚, 靶点 PTGS2 与活性成分木犀草素、黄芩素、千层纸素 A、黄芩黄酮的结合力较强。研究显示, AKT1 是与与血管内皮障碍相关的基因, 与高血压密切相关<sup>[25]</sup>。而 PTGS2 能够与内皮细胞、血小板上的 G 蛋白偶联, 从而可以激活 G 细胞, 造成 cAMP 升高, 进而激活蛋白激酶 A, 抑制血小板聚集, 引起血管平滑肌松弛, 因此, PTGS2 与高血压也存在一定的联系<sup>[26]</sup>。这充分说明 AKT1 和 PTGS2 在高血压中的重要作用, 同时也说明牛黄降压胶囊可能通过调节以上核心蛋白靶点起到抗高血压的作用。

对 AKT1 和 PTGS2 这两个核心靶点对应的活性成分,通过分子对接验证其与关键靶点蛋白的具体作用。研究结果显示,活性成分木犀草素、槲皮素、异鼠李素、山萘酚与靶点 AKT1 的结合力较强,活性成分木犀草素、黄芩素、千层纸素 A、黄芩黄酮与靶点 PTGS2 的结合能较高。分别对这些活性成分与靶点的相互作用情况进行分析,结果显示,对于 AKT1 靶点来说,木犀草素、槲皮素、异鼠李素、山萘酚等活性成分主要与受体结合部位的氨基酸 Gln79, Ser205, Thr211, Val271, Ile290 形成氢键相互作用;对于 PTGS2 靶点,活性成分木犀草素、黄芩素、千层纸素 A、黄芩黄酮等活性成分主要氨基酸残基 His39, Cys47, Tyr130, Gly135, Gln461, Glu465 形成氢键。同时,我们发现木犀草素与 AKT1 和 PTGS2 的结合力都较强,木犀草素是一种黄酮类化合物,主要来源于腊梅花等植物<sup>[27]</sup>。大量研究表明木犀草素具有多样化的功能:(1)木犀草素通过抑制炎症和氧化应激可以抗动脉粥样硬化<sup>[28, 29]</sup>;(2)木犀草素可以激活 PI3K/Akt 信号通路<sup>[30]</sup>、抑制 TLR-4/NF- $\kappa$ B 信号通路<sup>[31]</sup>,从而对心肌缺血再灌注损伤具有保护作用;(3)木犀草素通过下调 P53 蛋白的表达<sup>[32]</sup>、维持 Ca<sup>2+</sup> 的平衡<sup>[33]</sup>,从而起到抗心力衰竭的作用;(4)木犀草素具有抗高血压的功效<sup>[34]</sup>。吕立华等<sup>[35]</sup>发现木犀草素能降低自发性高血压大鼠(SHR)血压,升高 SHR 大鼠心肌组织 NO 浓度,下调 NF- $\kappa$ B p65 蛋白的表达,保护心肌组织。苏海华等<sup>[36]</sup>发现木犀草素可以降低细胞内钙离子浓度,抑制肾动脉收缩,扩张已收缩肾动脉,降低血压。另外,相关研究将大鼠暴露于氯化钠,大鼠各压力指标都有所增高,NO 显著下降,然而,使用木犀草素和氯化钠共同给药,血压几乎接近对照值,NO 的生物利用度也显著增加,同时,研究人员发现木犀草素可以通过抑制氧化应激和 NF- $\kappa$ B 的激活而改善氯化钠诱导的高血压<sup>[37]</sup>。

此外,KEGG 信号通路分析发现癌症通路可能是牛黄降压胶囊治疗高血压的关键信号通路,孙守桦等人<sup>[38]</sup>通过数据挖掘和网络药理学探讨了中药治疗肥胖合并高血压用药规律及作用机制,结果发现中药复方“天麻-白术-半夏-茯苓-陈皮”治疗肥胖合并高血压的关键通路有癌症通路。然而,关于癌症通路在高血压治疗中的具体研究较少,还有待进一步深入探讨。本文可以为深入研究中药治疗高血压的作用机制提供重要参考。

综上所述,本研究通过网络药理学和分子对接验证,牛黄降压胶囊主要通过活性成分木犀草素等介导 AKT1、PTGS2 等重要靶点,调控癌症通路、化学致癌-受体激活通路、PI3K-Akt 信号通路等,发挥降血压的功效。

#### 参考文献:

- [1] Zhao P, Shi W, Shi Y, et al. Positive association between weight-adjusted-waist index and hyperuricemia in patients with hypertension: the China H-type hypertension registry study[J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2022, 13:1007557
- [2] Mullen N, Curneen J, Donlon P T, et al. Treating primary aldosteronism-induced hypertension: novel approaches and future outlooks[J]. *Endocrine Reviews*, 2024, 45(1): 125-170.
- [3] Jobe M, Mactaggart I, Bell S, et al. Prevalence of hypertension, diabetes, obesity, multimorbidity, and related risk factors among adult Gambians: a cross-sectional nationwide study[J]. *The Lancet Global Health*, 2024, 12(1): e55-e65.
- [4] Meissner A, Miro F, Jiménez-Altayó F, et al. Sphingosine-1-phosphate signalling—a key player in the pathogenesis of Angiotensin II-induced hypertension. *Cardiovascular Research*, 2017, 113(2): 123-133.
- [5] Young C N. Endoplasmic reticulum stress in the pathogenesis of hypertension[J]. *Experimental Physiology*, 2017, 102(8): 869-884.
- [6] 秦萍, 廖玉华, 邱志华. 生物靶向治疗高血压的研究进展 [J]. *临床心血管病杂志*, 2023, 39(1): 6-10.
- [7] 余虹. 治疗冠心病的中药和天然药物制剂的分类及其临床应用 [J]. *临床医学前沿*, 2023, 5(4): 126-128.
- [8] Newman D J, Cragg G M, Snader K M. The influence of natural products upon drug discovery[J]. *Natural Product Reports*, 2000, 17(3): 215.
- [9] Ji H F, Li X J, Zhang H Y. Natural products and drug discovery. Can thousands of years of ancient medical knowledge lead us to new and powerful drug combinations in the fight against cancer and dementia?[J] *Embo Reports*, 2009, 10(3): 194-200.
- [10] 李爱秀. 中药“药效团药性假说”的提出 [J]. *天津药学*, 2007, 019(2): 41-44.
- [11] 占慧慧, 邓丹, 刘媛, 等. 基于指纹图谱和网络药理学的茯苓 4 个药用部位饮片质量标志物预测分析 [J]. *中国药*

学杂志, 2023, 58(10): 891-907.

[12] Gao P, Lu C, Zhang F, et al. Integrated GC - MS and LC - MS plasma metabolomics analysis of ankylosing spondylitis. *Analyst*, 2008, 133(9): 1214.

[13] 王毅, 程翼宇. 中药组效关系辨识方法学与计算理论研究思路与策略 [J]. *Chinese Journal of Natural Medicines 中国天然药物*, 2003, 1(3): 178-181.

[14] 胡宇豪, 苏进博, 杨洋, 等. 基于网络药理学和分子对接技术探究苍术香连散治疗猪湿热泄泻的作用机制 [J]. *中国畜牧兽医*, 2023, 50(12): 5136-5147.

[15] 王吉荣, 史小飞, 种育晖, 等. 基于网络药理学与分子对接技术对白术 - 半夏 - 茯苓配伍治疗胰腺癌作用机制的研究 [J]. *药学实践杂志*, 2023, 41(10): 616-624.

[16] 王素玉, 崔亚丽, 刘树理, 等. 安宫牛黄丸对高血压合并 2 型糖尿病患者心脑血管疾病的预防作用 [J]. *中国中西医结合急救杂志*, 2022, 29(3): 311-314.

[17] 刘殿平, 李景胜. 牛黄降压丸治疗高血压病疗效观察 [J]. *中国实用医药*, 2008, 003(30): 151-152.

[18] 刘静. 牛黄降压丸对改善心功能的临床效果分析. *中国医药指南*, 2016, 33: 168.

[19] Hui-Juan M, 周春芬. 牛黄降压丸改善心功能的临床疗效观察. *中草药*, 2001, 32(4): 343-345.

[20] Morris G M, Huey R, Lindstrom W, et al. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility[J]. *Journal of computational chemistry*, 2009, 30(16): 2785-2791.

[21] Morris G M, Goodsell D S, Halliday R S, et al. Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function[J]. *Journal of computational chemistry*, 1998, 19(14): 1639-1662.

[22] Mills K T, Stefanescu A, He J. The global epidemiology of hypertension[J]. *Nature Reviews Nephrology*, 2020, 16(4): 223-237.

[23] Dziejdzak J, Zaleska-Żmijewska A, Szaflik J P, et al. Impact of arterial hypertension on the eye: a review of the pathogenesis, diagnostic methods, and treatment of hypertensive retinopathy[J]. *Medical Science Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research*, 2022, 28:

e935135-1.

[24] The Committee of Hypertension Prevention and Cure in Chinese. Guidebook of hypertension prevention and cure in Chinese 2004 (practical book) [J]. *Chin J Hypert (高血压杂志)*, 2004, 12(6): 483-486.

[25] 袁野, 申春梯, 陈炳为. 高血压病阴虚阳亢证的基因网络研究 [J]. *南京中医药大学学报*, 2016, 32(1): 6-9.

[26] 龙红萍, 蔺晓源, 王宇红, 等. 基于网络药理学研究复方钩藤降压片治疗高血压的作用机制 [J]. *中国中药杂志*, 2018, 43(7): 1360-1365.

[27] Irondi E A, Agboola S O, Oboh G, et al. Guava leaves polyphenolics-rich extract inhibits vital enzymes implicated in gout and hypertension in vitro[J]. *Journal of intercultural ethnopharmacology*, 2016, 5(2): 122.

[28] Boyle Jr E M, Kovacich J C, Canty Jr T G, et al. Inhibition of nuclear factor-kappa B nuclear localization reduces human E-selectin expression and the systemic inflammatory response[J]. *Circulation*, 1998, 98(19 Suppl): II282-8.

[29] Hattori S, Kamiya T, Hara H, et al. CoCl2 decreases EC-SOD expression through histone deacetylation in COS7 cells[J]. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 2016, 39(12): 2036-2041.

[30] Zhang R, Li D, Xu T, et al. Antioxidative effect of luteolin pretreatment on simulated ischemia/reperfusion injury in cardiomyocyte and perfused rat heart[J]. *Chinese journal of integrative medicine*, 2017, 23: 518-527.

[31] Zhang X, Du Q, Yang Y, et al. The protective effect of Luteolin on myocardial ischemia/reperfusion (I/R) injury through TLR4/NF-κB/NLRP3 inflammasome pathway[J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2017, 91: 1042-1052.

[32] Chang H, Li C, Huo K, et al. Luteolin Prevents H2O2 - Induced Apoptosis in H9C2 Cells through Modulating Akt - P53/ Mdm2 Signaling Pathway[J]. *BioMed research international*, 2016, 2016(1): 5125836.

[33] Yan Q, Li Y, Yan J, et al. Effects of luteolin on regulatory proteins and enzymes for myocyte calcium circulation in hypothermic preserved rat heart[J]. *Experimental and therapeutic medicine*, 2018, 15(2): 1433-1441.

[34] 王清岑, 殷新, 周罗慧, 等. 木犀草素心血管保护作用研究进展 [J]. 中国现代医学杂志, 2020, 30(11): 4.

[35] 吕立华, 吕林华, 张玉碧. 木犀草素对自发性高血压大鼠心肌组织的保护作用及 NF- $\kappa$ B 表达的影响 [J]. 时珍国医国药, 2011, 22(7): 3.

[36] 何晴, 张婷, 苏海华. 木犀草素对肾性高血压的治疗效果及机制 [J]. 中国处方药, 2020, 18(10): 4.

[37] Oyagbemi A A, Omobowale T O, Ola - Davies O E, et al. Luteolin - mediated Kim - 1/NF -  $\kappa$ B/Nrf2 signaling pathways protects sodium fluoride - induced hypertension and cardiovascular complications[J]. Biofactors, 2018, 44(6): 518-531.

[38] 孙守桦. 基于数据挖掘和网络药理学探讨中药治疗肥胖合并高血压用药规律及作用机制 [D]. 沈阳: 辽宁中医药大学, 2023.

#### 作者简介:

温孟昊, 2004年, 男, 汉族, 山东省烟台市招远市, 本科在读, 临沂大学, 无, 食品科学与工程。

通讯作者: 王芳芳, 博士, 副教授, 研究方向: 计算机模拟。

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目 (No. 32001699); 临沂大学大学生创新创业训练计划项目 (X202410452431)