基于网络药理学分析柿叶治疗心血管疾病的药效物质基础及作用机制

刘方[1]，杨沙[2]，陈启洪[2]，段灿灿[3]，晏仁义[4]，张建永[2]，李晓飞[1]（1. 遵义医科大学基础医学院，贵州 遵义 563000；2. 遵义医科大学药学院，贵州 遵义 563000；3. 遵义医科大学基础药理教育部重点实验室暨特色民族药教育部国际合作联合实验室，贵州 遵义 563003；4. 天津益倍元天然产物技术有限公司，天津 300457）

摘要：目的 基于网络药理学分析柿叶治疗心血管疾病的药效物质基础及作用机制。**方法** 检索 Si-noMed、中国知网、万方等数据库获取柿叶中的化学成分，成分录入 Targetnet 数据库进行潜在靶点钓取，再将靶点导入 CTD 数据库获得关联疾病，采用 DAVID 数据库对靶点进行基因功能及通路富集分析。以 Cytoscape 软件构建成分-靶点网络，靶点-疾病网络，提取核心成分和靶点，构建“核心成分-核心靶点-信号通路”核心网络。**结果** 共收集到柿叶中 54 个成分，可作用于 43 个靶点。多元及核心网络分析结果显示，山奈酚(Kaempferol)、槲皮素(Quercetin)、白花蛇床子素(Droserone)等成分是治疗心血管疾病的主要物质基础，柿叶中的成分主要作用于酪氨酸蛋白磷酸酶非受体 1 型(PTPN1)、花生四烯酸-15-脂加氧酶(ALOX15)、雌激素受体 2(ESR2)、雌激素受体 1(ESR1)、前列腺素 G/H 合成酶 1(PTGS1)等关键靶点，进一步调节催乳素信号通路(Prolactin signaling pathway)、血管内皮生长因子信号通路(VEGF signaling pathway)以及花生四烯酸代谢(Arachidonic acid metabolism)等信号通路来发挥治疗心血管疾病的作用。**结论** 本研究揭示了柿叶多成分、多靶点、多途径的作用规律，为深入开展柿叶治疗心血管疾病的作用机制研究提供了新的依据。

关键词：柿叶；心血管疾病；网络药理学；核心网络；作用机制

中图分类号：R285.5 **文献标志码：**A **文章编号：**1003-9783(2019)08-0943-09

doi：10.19378/j.issn.1003-9783.2019.08.009

Analysis of the Pharmacodynamic Substances and Mechanisms of Persimmon Leaves in the Treatment of Cardiovascular Diseases Based on Network Pharmacology

LIU Fang[1], YANG Sha[2], CHEN Qihong[2], DUAN Cancan[3], YAN Renyi[4], ZHANG Jianyong[2], LI Xiaofei[1] (1. Basic Medical School, Zunyi Medical University, Zunyi 563000 Guizhou, China; 2. School of Pharmacy, Zunyi Medical University, Zunyi 563000 Guizhou, China; 3. Key Laboratory of Basic Pharmacology of Ministry of Education and Joint International Research Laboratory of Ethnomedicine of Ministry of Education, Zunyi Medical University, Zunyi 563003 Guizhou, China; 4. Tianjin Ubasic-Ingredient Natural Products Co, Ltd, Tianjin 300457, China)

Abstract: Objective To explore the pharmacodynamic material basis and mechanism of persimmon leaves in the treatment of cardiovascular diseases based on network pharmacology. **Methods** The chemical constituents in persimmon leaves were obtained by searching the databases including Si-noMed, CNKI, *Wanfang*, *et al*. The interaction targets were predicted by Targetnet database. The corresponding diseases were obtained by importing the targets into the online CTD database. The gene function and pathway enrichment of the potential targets were studied by DAVID online analysis database. Finally, the component-target interaction network and target-disease interaction network were constructed by Cytoscape software. The core network of “core component- core target- signaling

收稿日期：2018-12-26

作者简介：刘方，女，在读硕士研究生，研究方向：中药作用机理研究。Email：274302308@qq.com。通信作者：李晓飞，博士，教授，研究方向：中药学。Email：lixiaofei35@sohu.com。张建永，博士，副教授，研究方向：中药学。Email：zhangjianyong2006@126.com。

基金项目：国家自然科学基金项目(81803838)；国家自然科学基金项目(81760746)；贵州省教育厅科技拔尖人才项目(黔教合 KY 字[2017]078)。

(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

pathway" was constructed by extracting components and targets and pathways with higher degree. **Results** A total of 54 components from persimmon leaves were collected，and these targets could act with 43 targets. Kaempferol，quercetin，droserone and other components were found to be the main material basis for the treatment of cardiovascular diseases by multivariate and core network analysis. The components from persimmon leaves can further regulate the signal pathways of Prolactin signaling pathway，VEGF signaling pathway and Arachidonic acid metabolism by acting on key targets such as PTPN1，ALOX15，ESR1，ESR2，PTGS1 and MAOA，to treat cardiovascular diseases. **Conclusion** This study reflects the multi-component，multi-target and multi-pathway action of persimmon leaves，and provides a new basis for further research on the mechanism of persimmon leaves in the treatment of cardiovascular diseases.

Keywords：Persimmon leaves；cardiovascular diseases；network pharmacology；core network；mechanism of action

心血管疾病(cardiovascular disease，CVD)是目前世界上一类发病率较高的慢性疾病，在中国 CVD 患病率及死亡率仍处于持续上升阶段，已成为重大的公共卫生问题[1]。临床治疗 CVD 的药物较多，如他汀类药物、抗凝剂、β 受体阻滞剂等[2]。然而，这些药物在使用中仍存在不良反应及耐药性等[3-4]。因此研发新的防治 CVD 的药物具有重要意义。

柿树资源在我国较丰富，主要分布于华东、中南等地，柿叶为柿科植物柿 *Diospyros kaki* Thunb. 的干燥叶，具有活血止血，生津止渴等功效。目前从柿叶中已经分离到了黄酮和萜类等化合物[5-6]，且柿叶提取物已被 2015 版《中国药典》收录，被证明具有较强的心血管活性[7-8]。临床发现以柿叶为主药的"脑心宁"注射液对高血压、冠心病患者的总有效率达 96.3%[9]；含柿叶并为主药的"脑心清"胶囊也可通过升高冠心病患者血液中的高密度脂蛋白含量，从而缓解症状[10]。因此，柿叶在临床治疗 CVD 具有很大的潜力。然而，其治疗 CVD 的物质基础与作用机制仍不明确，因此探索柿叶治疗 CVD 的活性成分及其关联的作用靶点，揭示柿叶治疗 CVD 的作用机制，对于深入开发柿叶具有重要意义。

网络药理学作为一种从整体层次预测药物治疗疾病作用机制的新方法[11]，可通过"多成分、多靶点、多途径"的整合策略，结合成分、蛋白、基因等数据库，采用生物信息学等手段构建和分析多元生物网络，探索药物的作用机制。网络药理学这种整体性的特点与中药多成分协同起效的作用机制的特点不谋而合，可从系统水平揭示中药的活性成分、阐明中药作用靶点及机制，为中药现代化研究带来新的思路与方法[12-13]。本研究采用网络药理学的方法，通过构建不同生物网络，对柿叶治疗 CVD 进行整体分析，研究其治疗 CVD 的物质基础与作用机制，为挖掘其药用价值提供新的思路与线索。

1 材料与方法

1.1 柿叶成分的收集 检索国内外各种文献数据库，包括中文期刊数据库 Si-noMed(http：//www.sinomed.ac.cn)、中国知网、万方、Pubmed(http：//pubmed.com.cutestat.com)和 TCMSP 数据库(http：//lsp.nwu.edu.cn/tcmsp.php)，收集目前柿叶中分离得到的成分。再利用 Pubchem(https：//pubchem.ncbi.nlm.nih.gov)、Chemical Book(http：//www.chemicalbook.com)和 ADMETlab(http：//admet.scbdd.com)数据库等平台对每一个成分的化学结构进一步确证，最后采用 ChemBioDraw13.0 软件绘制结构，优化结构后，统一保存为"sdf"格式文件。

1.2 成分潜在靶点预测 采用 Targetnet(http：//targetnet.scbdd.com)数据库对柿叶成分进行潜在靶点在线预测，遴选条件为 AUC ≥ 0.7，其中 AUC 代表采用方法的模型预测准确率，经过预测得到包括 Uniprot_ID、Protein、Prob(> 0.9)等信息的柿叶成分作用的潜在靶点群[14]，同时利用 UniProt(http：//www.uniprot.org)数据库剔除非人源的潜在靶点。

1.3 成分-靶点网络构建与分析 采用 Cytoscape 3.6.1 软件，将成分与靶点相互作用关系构建"成分-靶点"网络，进一步采用 Network analysis 插件对网络特征指标度(degree)和介数(Betweenness)进行分析。

1.4 靶点-疾病网络构建与分析 将靶点蛋白导入 CTD 数据库(https：//ctdbase.org/tools/batchQuery.go)中进行相关疾病的深入分析，剔除与 CVD 无关的靶点。然后采用 Cytoscape 3.6.1 软件，构建"靶点-疾病"网络，进一步以软件自带的 Network analysis 插

(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

件对 Degree 和 Betweenness 进行分析。并根据人类孟德尔遗传数据库(OMIM)(http：//www.omim.org)对不同类别的疾病进行归纳和分类。

1.5 靶点蛋白的基因功能和通路分析 为进一步分析柿叶潜在作用靶点的基因功能及其参与的主要信号通路，本研究采用 DAVID(https：//david.ncifcrf.gov)在线数据库，对柿叶作用的靶点进行基因功能及信号通路富集分析。设定阈值 P-value < 0.05，获取靶点参与的主要信号通路，并使用 Omicshare(http：//www.omicshare.com/tools/index.php/Home/Soft/trend)在线分析平台对富集分析结果进行可视化，解析柿叶治疗 CVD 的的主要信号通路，揭示柿叶治疗 CVD 作用的可能机制。

1.6 整合核心网络分析 在上述“成分-靶点”网络的基础上，以 2 倍 degree 的中位数为核心节点，遴选核心成分和核心靶点。再根据核心成分与核心靶点的对应关系，核心靶点与信号通路的关系，整合构建“核心成分-核心靶点-通路”网络，阐释主要药效物质基础和作用机制。

2 结果

2.1 柿叶成分的收集 通过检索数据库共收集到柿叶中的化学成分共 54 个，其中包含黄酮类 24 个，萘醌和萘酚等 16 个，三萜类 14 个，具体见表 1。

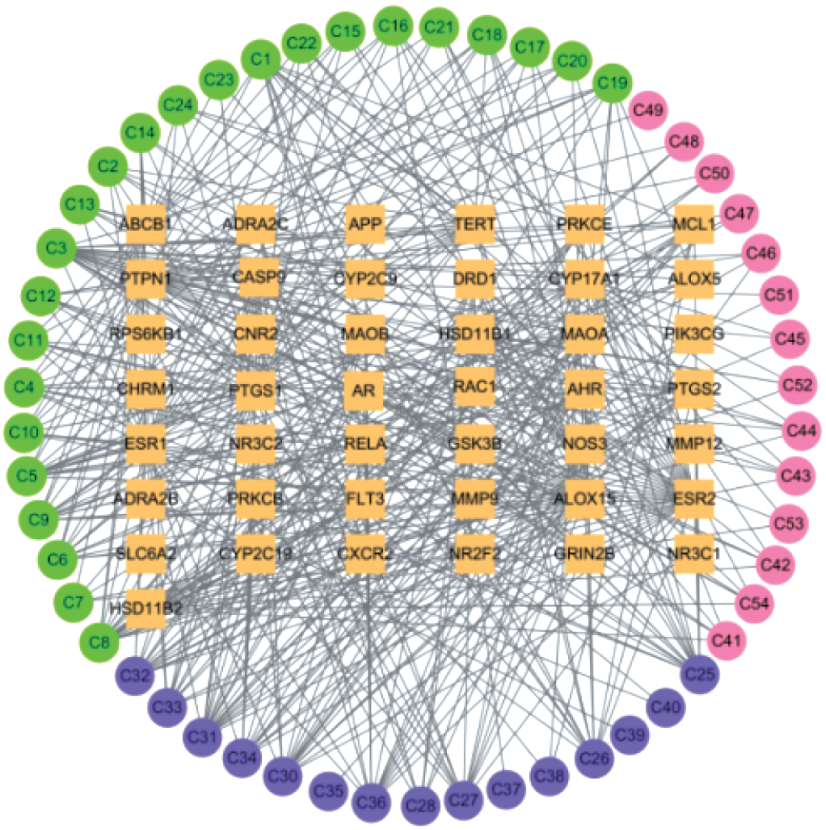
2.2 成分-靶点网络构建与分析 如图 1 所示，柿叶“成分-靶点”网络包含了 97 个节点，其中 54 个成分，43 个靶点；它们由 417 条边相连构成一个完整的成分-靶点网络，每条边代表成分和靶点的相互作用，平均 degree 为 4.3，其中 degree 排名前 5 的成分是山奈酚(kaempferol)、槲皮素(quercetin)、白花蛇

表 1 柿叶中的化学成分信息

Table 1 Information of components in persimmon leaves

编号	化合物名称	度	类别	编号	化合物名称	度	类别
C1	Astragalin	14	黄酮类	C28	Diospro	7	萘醌和萘酚
C2	Isoquercitrin	7	黄酮类	C29	Diosprols-8,8′-di-O-(6-β-O-apiofuranosyl-β-D-glucopyranoside)	2	萘醌和萘酚
C3	Kaempferol	22	黄酮类	C30	Diospyrin	15	萘醌和萘酚
C4	Kaempferol-3-O-α-Lrhamnopyranoside	12	黄酮类	C31	Droserone	18	萘醌和萘酚
C5	Myricetin	16	黄酮类	C32	Eliptinone	15	萘醌和萘酚
C6	Myricetin-3-O-α-Lrhamnopyranoside	11	黄酮类	C33	Maritinone	11	萘醌和萘酚
C7	Myricetin-3-O-β-D-glucopyranoside	4	黄酮类	C34	Plumbgin	14	萘醌和萘酚
C8	Quercetin	20	黄酮类	C35	Naphthyl quinone two polymer derivative	1	萘醌和萘酚
C9	Quercetrin	14	黄酮类	C36	4,3′-dihydroxy-α-truxillic acid	16	萘醌和萘酚
C10	Rutin	10	黄酮类	C37	Kakispyrol	1	萘醌和萘酚
C11	Astragalin	8	黄酮类	C38	Kakispyrone	3	萘醌和萘酚
C12	Hyperoside	8	黄酮类	C39	LinarionosideA	1	萘醌和萘酚
C13	Isorhamnetin-3-o-β-D-glucopyranoside	6	黄酮类	C40	LinarionosideB	2	萘醌和萘酚
C14	Kaempferol-3-O-(2′′-galloy)-glucoside	6	黄酮类	C41	Betulin	5	三萜类
C15	Kaempferol-3-O-(2′′-galloy)-glucoside	6	黄酮类	C42	Betulinaldehyde	5	三萜类
C16	Kaempferol-3-O-β-D-galactopyranoside	8	黄酮类	C43	Oleanolic acid	5	三萜类
C17	Quercetin-3-O-(2′′-galloy)-glucoside	6	黄酮类	C44	β-amyrin	5	三萜类
C18	Quercetin-3-O-(2′′-galloy)-glucoside	8	黄酮类	C45	Betulinic acid	3	三萜类
C19	Quercetin-3-O-β-D-galactopyranoside	10	黄酮类	C46	Lupeol	4	三萜类
C20	Quercetin-3-O-β-D-glucopyranosyl-(6-1)-α-L-rhamnopyranoside	6	黄酮类	C47	19α,24-dihydroxy ursolic acid	3	三萜类
C21	Isorham netin	6	黄酮类	C48	Barbinervic acid	3	三萜类
C22	2-o-rhamnosyl-vitexin	6	黄酮类	C49	Kakisaponin A	1	三萜类
C23	8-C-[α-L-rhamnopyranosyl-(1-4)]-α-D-glucopyranosylapigenin	3	黄酮类	C50	Pomolic acid	3	三萜类
C24	Vitexin	6	黄酮类	C51	Rosamutin	2	三萜类
C25	3,3′-biplumbagin	17	萘醌和萘酚	C52	Ursolic acid	4	三萜类
C26	Chitranone	14	萘醌和萘酚	C53	Uvao	3	三萜类
C27	Cis-isoshinanoione	13	萘醌和萘酚	C54	α-amyrin	6	三萜类

(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net



注：绿色代表黄酮类成分；紫色代表萘醌和萘酚类成分；粉红色代表三萜类成分。

图 1　柿叶成分-靶点网络图

Figure 1　Components-target network of persimmon leaves

床子素(droserone)、3，3'-双白花丹素(3，3'-biplumbagin)、杨梅素(myricetin)，degree 分别为 22、20、18、17、16。度值排名前 5 的靶点是酪氨酸蛋白磷酸酶非受体 1 型(PTPN1)、花生四烯酸-15-脂加氧酶(ALOX15)、雌激素受体 2(ESR2)、雌激素受体 1(ESR1)、前列腺素 G/H 合成酶 1(PTGS1)，degree 分别为 34、34、31、31、30。

2.3 靶点-疾病网络分析　通过 CTD 分析发现柿叶的潜在作用靶点与 57 种疾病相关。以 degree > 2，betweenness > 0 进一步筛选，最后得到疾病共 26 种(表 2)。根据 OMIM 数据库，对所得疾病进行分类，得到 CVD、CVD 并发症及其他疾病并发 CVD 等 3 种不同类型。如图 2 所示，将上述靶点-疾病之间的相互关系采用 cytoscape 3.6.1 构建网络图，其中不同颜色的节点分别代表 CVD、CVD 并发症、其他疾病并发 CVD。通过网络分析可知，43 个靶点可作用于 26 种疾病，按照疾病类型分析可知，CVD 的作用靶点较多(degree = 66)，而 CVD 并发症(degree = 40)适中、其他疾病引发 CVD 最少(degree = 1)，表明柿叶在治疗 CVD 方面具有优势，不但可治疗 CVD，且对 CVD 的并发症均有影响，符合中医将柿叶用于治疗 CVD 的传统理念。

2.4 GO 生物进程分析　将柿叶作用的 43 个靶点蛋白进行 GO 生物进程分析，得到生物进程层级关系(如图 3 所示)。共有 40 个生物进程，其中排名前 10 的生物进程见表 3，主要涉及外源性凋亡信号通路的负调节、妇女妊娠进程、糖皮质激素生物合成进程、糖皮质激素代谢进程等方面。通过分析可知，柿叶可能调控以上生物进程治疗 CVD。

2.5 KEGG 通路富集分析　采用 DAVID 在线分析平台对柿叶作用的 43 个靶点进行 KEGG 通路富集分析，结果如图 4 所示。以影响因子(Rich factor，RF)、*P* 值以及调控通路上的基因个数来衡量 KEGG 富集程度，其中 RF 指差异表达的基因中位于该通路条目的基因数目与所有注释基因中位于该通路条目的目的基因总数的比值，且 RF 越大，富集的程度越大。研究结果发现柿叶作用靶点主要富集于催乳素信号通路(Prolactin signaling pathway)、血管内皮生长因子信号通路(VEGF signaling pathway)以及花生四烯酸代谢(Arachidonic acid metabolism)这 3 条信号

(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

表 2　柿叶成分潜在靶点作用疾病的信息(degree>2、betweenness>0)

Table 2　Information of diseases affected by potential targets of components in persimmon leaves(degree > 2, betweenness > 0)

Disease Name(疾病名称)	Disease Categories(疾病分类)	Degree (度)	Betweenness (介数)	Disease Name(疾病名称)	Disease Categories(疾病分类)	Degree (度)	Betweenness (介数)
Reperfusion Injury (再灌注损伤)	Cardiovascular disease|Pathology (process)(心血管疾病|病理学进程)	7	0.07802737	Atherosclerosis (动脉粥样硬化)	Cardiovascular disease (心血管疾病)	7	0.09073883
Arrhythmias, Cardiac (心律失常)	Cardiovascular disease|Pathology (process)(心血管疾病|病理学进程)	2	0.00770044	Aortic Aneurysm, Abdominal (腹主动脉瘤)	Cardiovascular disease (心血管疾病)	2	0.01025878
Atrial Fibrillation (心房颤动)	Cardiovascular disease|Pathology (process)(心血管疾病|病理学进程)	4	0.02370037	Cardiomyopathies (心肌病)	Cardiovascular disease (心血管疾病)	4	0.0914679
Myocardial Reperfusion Injury (心肌再灌注损伤)	Cardiovascular disease|Pathology (process)(心血管疾病|病理学进程)	2	0.00991240	Cardiovascular Diseases (心血管疾病)	Cardiovascular disease (心血管疾病)	3	0.01742148
Cardiomegaly (心脏肥大)	Cardiovascular disease|Pathology (anatomical condition) (心血管疾病|病理学在解剖学条件)	6	0.05458997	Coronary Artery Disease (冠状动脉疾病)	Cardiovascular disease (心血管疾病)	5	0.04113162
Hypertrophy, Left Ventricular (左室肥厚)	Cardiovascular disease|Pathology (anatomical condition) (心血管疾病|病理学在解剖学条件)	2	0.00102000	Heart Failure (心力衰竭)	Cardiovascular disease (心血管疾病)	8	0.10174408
Infarction, Middle Cerebral Artery (脑中动脉梗塞)	Cardiovascular disease|Nervous system disease(心血管疾病|神经系统疾病)	4	0.04505885	Thrombosis (血栓形成)	Cardiovascular disease (心血管疾病)	3	0.02546815
Brain Ischemia (脑缺血)	Cardiovascular disease|Nervous system disease(心血管疾病|神经系统疾病)	5	0.05290551	Hypertension (高血压病)	Cardiovascular disease (心血管疾病)	5	0.0837337
Stroke (脑卒中)	Cardiovascular disease|Nervous system disease(心血管疾病|神经系统疾病)	2	0.02127660	Myocardial Infarction (心肌梗塞)	Cardiovascular disease (心血管疾病)	8	0.22532021
Ischemic Attack, Transient (短暂性脑缺血发作)	Cardiovascular disease|Nervous system disease(心血管疾病|神经系统疾病)	2	0.00589419	Myocardial Ischemia (心肌缺血)	Cardiovascular disease (心血管疾病)	2	0.00825782
Diabetic Angiopathies (糖尿病血管病变)	Cardiovascular disease|Endocrine system disease(心血管疾病|内分泌系统疾病)	2	0.00211062	Cardiomyopathy, Dilated (扩张性心肌病)	Cardiovascular disease (心血管疾病)	2	9.38E-04
Heart Defects, Congenital (先天性心脏缺陷)	Cardiovascular disease|Congenital abnormality(心血管疾病|先天性异常)	2	0.04209563	Ventricular Dysfunction, Left (左心室功能障碍)	Cardiovascular disease (心血管疾病)	2	9.38E-04
Hypertension (高血压病)	Cardiovascular disease (心血管疾病)	15	0.26805813	Multiple Myeloma (多发性骨髓瘤)	Blood disease|Cancer|Cardiovascular disease|Immune system disease(血液疾病|癌症|心血管疾病|免疫系统疾病)	1	0.00113162

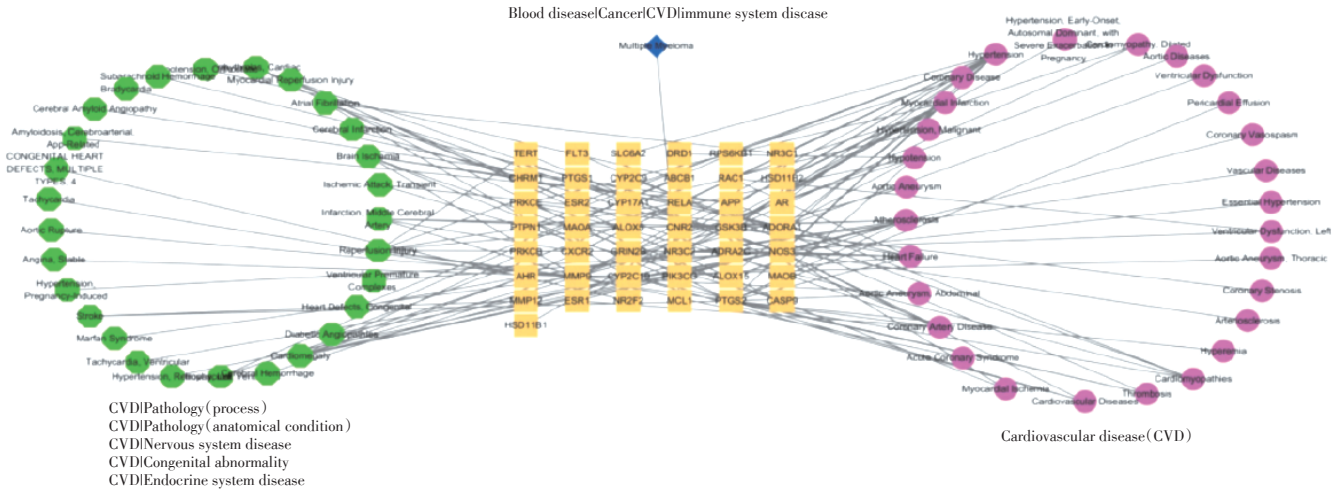


图 2　柿叶靶点-疾病-网络图

Figure 2　Target-disease-network of persimmon leaves

通路。

2.6 核心成分-核心靶点-信号通路整合网络分析　通过分析成分-靶点网络可知，成分 degree 中位数为 7.5、靶点 degree 中位数为 15，2 倍中位数分别为 15、30。按此标准，最终筛选到核心成分 8 个，核心靶点 5 个，具体见表 4~5。如图 5 所示，根据核心

(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

表 3　柿叶治疗 CVD 靶点的生物进程分析结果

Table 3　Biological process analysis of CVD targets treated by persimmon leaves

GO 生物进程	基因数	百分比/%	P-Value
Histone phosphorylation(组蛋白磷酸化)	3.00	5.45	0.00
Negative regulation of extrinsic apoptotic signaling pathway(外源性凋亡信号通路的负调控)	6.00	4.26	0.00
Hydrogen peroxide metabolic process (过氧化氢代谢进程)	3.00	4.55	0.00
Positive regulation of blood pressure (正向血压调控)	3.00	6.12	0.00
Regulation of nitric-oxide synthase activity (一氧化氮合酶活性的调节)	3.00	4.62	0.00
Maternal process involved in female pregnancy (妇女妊娠进程)	4.00	4.44	0.00
Glucocorticoid metabolic process (糖皮质激素代谢进程)	3.00	9.68	0.00
Glucocorticoid biosynthetic process (糖皮质激素生物合成进程)	3.00	15.00	0.00
Regulation of systemic arterial blood pressure by hormone(激素对系统动脉血压的调节)	3.00	4.76	0.00
Regulation of systemic arterial blood pressure mediated by a Chemical signal (化学信号介导的全身动脉血压调节)	3.00	4.05	0.00

成分-核心靶点及其关联信号通路的对应关系，构建“核心成分-核心靶点-信号通路”网络，其中柿叶中 8 个核心成分可作为柿叶治疗 CVD 的主要药效物质基础，这些成分可通过作用于 5 个核心靶点及其关联的 10 条主要信号通路发挥治疗 CVD 的作用。其中 5-羟色胺能突触通路(Serotonergic synapse pathway)、胰岛素抵抗途径(Insulin resistance pathway)、花生四烯酸代谢(Arachidonic acid metabolism)以及催乳素信号通路(Prolactin signaling pathway pathway)共 4 条通路为核心成分的主要调节通路。综上可知，上述整合网络分析体现了柿叶的多成分、多靶点、多通路整合角度来治疗 CVD 的作用特点，同时也体现了中药“多成分、多层次、多靶点”的特性，彰显了中医药在复杂疾病治疗中的优势。

3　讨论

柿叶资源丰富，入药方便，临床疗效确切，是我国民间常用的药材。如在《广西中药材标准(1990 版)》中收载记录柿叶具有活血化瘀等效用，临床可用于治疗高血压、脑动脉硬化症、冠心病等[15]。且以柿叶为主要原料的中药制剂已广泛应用于临床实践，如柿叶提取物制成的“脑心清片”、“脑心清胶囊”[16]。已有研究发现柿叶中黄酮类成分对缺氧和晚期糖基化终产物诱导的乳鼠心肌细胞凋亡均有明显的抑制作用[17]。且柿叶醇提取物能显著降低高脂血症大鼠的甘油三酯(TG)、总胆固醇(TC)和低密度脂蛋白(LDL-C)水平，显著升高密度脂蛋白(HDL-C)，同时可明显减小心肌缺血大鼠的心肌梗死范围，显著减少其心率失常的发生率[18]。综上，临床和基础实验均发现柿叶具有较好的心血管活性，但其药效物质基础和作用机制尚不十分清楚。

本研究采用网络药理学方法分析柿叶治疗 CVD 的药效物质基础及作用靶点，通过多元网络分析，根据 degree 遴选出网络中治疗 CVD 的主要成分和重要靶点，同时通过提取核心成分-核心靶点-信号通路的整合网络以期为揭示柿叶的药效物质基础及多

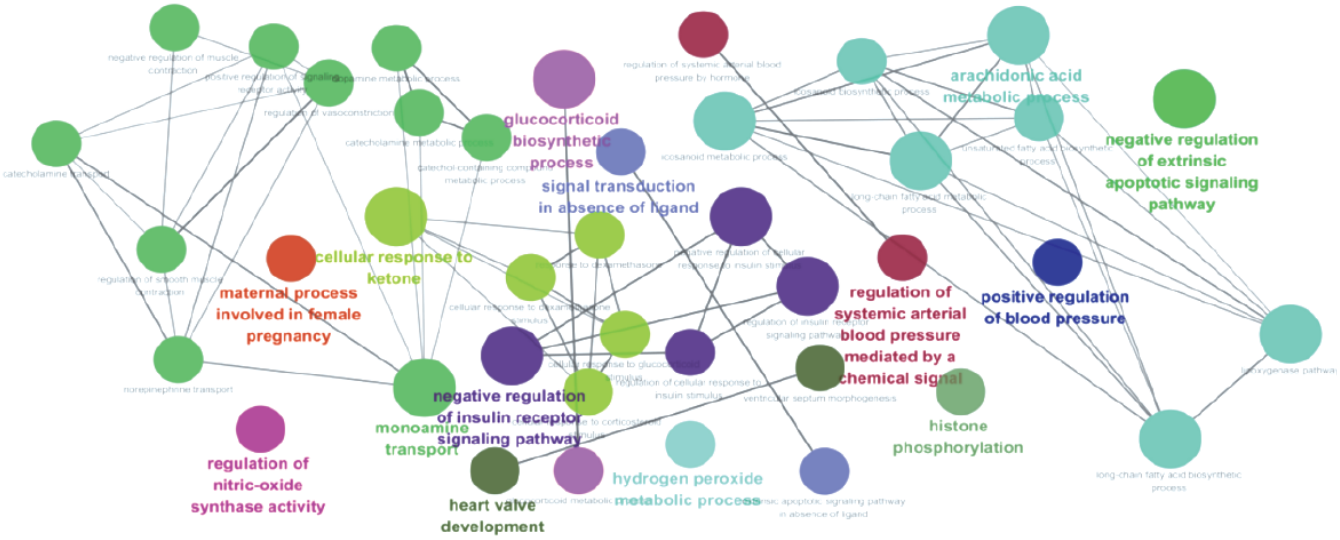


图 3　靶点的 GO 生物进程层级关系

Figure 3　Hierarchical relationship of biological process by GO of targets

(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

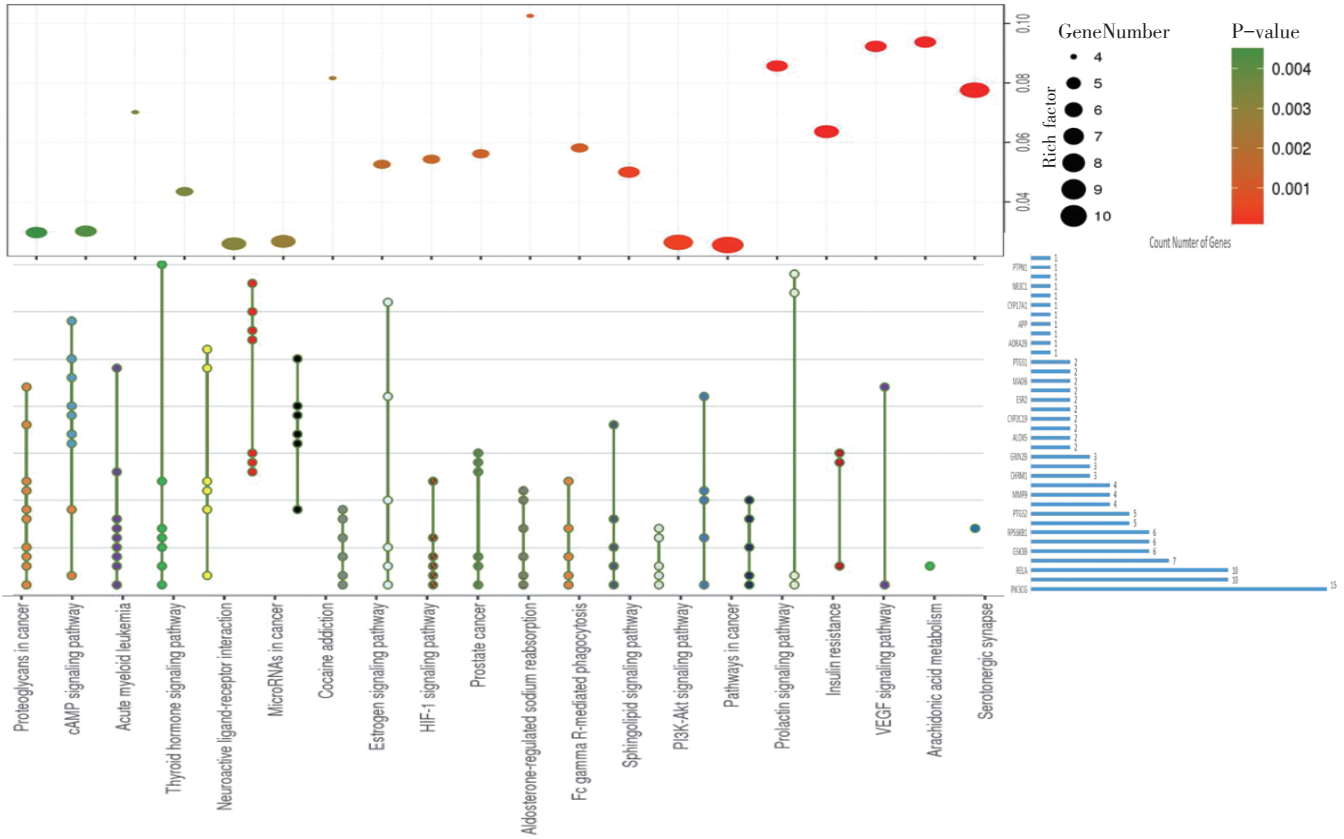


图 4　前 20 个 KEGG 通路富集气泡图($P \leqslant 0.05$)

Figure 4　Enrichment bubble diagrams of the top 20 KEGG pathway

表 4　柿叶核心成分信息

Table 4　Information of core compounds in persimmon leaves

Name	compound	Attribute	Degree	Betweenness
C3	Kaempferol	mol	22	0.0983412
C8	Quercetin	mol	20	0.06133606
C31	Droserone	mol	18	0.07374391
C25	3,3′-biplumbagin	mol	17	0.03904147
C5	Myricetin	mol	16	0.02279529
C36	4,3′-dihydroxy-α-truxillic acid	mol	16	0.06322127
C32	Eliptinone	mol	15	0.0352428
C30	Diospyrin	mol	15	0.05425682

表 5　柿叶核心靶点信息

Table 5　Information of core targets of persimmon leaves

Name	Protein name	Attribute	Degree	Betweenness
PTPN1	Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 1	target	34	0.21966113
ALOX15	Arachidonate 15-lipoxygenase	target	34	0.12267868
ESR2	Estrogen receptor beta	target	31	0.06875063
PTGS1	Prostaglandin G/H synthase 1	target	30	0.0676195
ESR1	Estrogen receptor	target	30	0.06467801

靶点、多途径治疗 CVD 的整合作用机制提供参考。

根据 degree 的大小，成分-靶点网络拓扑分析结果发现柿叶发挥作用成分的来源含 3 个黄酮类成分，分别为 kaempferol（degree=22）、quercetin（degree=20）、myricetin（degree=16）；萘醌和萘酚类 3 个，分别为 droserone（degree=18）、3，3’- biplumbagin（degree=17）、4，3’- dihydroxy- α- truxillic acid（degree=16）；三萜类 1 个，为 α-amyrin（degree=6），表明这些成分可能是柿叶发挥心血管活性的主要药效物质基础。上述成分的实验药理学结果也进一步佐证了本研究的预测，如有研究发现 kaempferol 可减轻糖尿病大鼠心肌缺血再灌注损伤，其机制与降低 AGE-RAGE/丝裂原活化蛋白激酶（MAPK）诱导的氧化应激和炎症反应有关[19]；quercetin 可抑制大鼠腹主动脉缩窄性心肌肥厚，改善心脏舒张功能[20]；myricetin 被证明可显著提高缺血再灌注大鼠左室压和冠脉流量的最大升降速率，降低心肌肌酸激酶和乳酸脱氢酶水平，减少大鼠梗死面积和心肌细胞凋亡[21]；droserone 对急性心肌缺血/再灌注所致的大鼠心肌损伤具有保护作用，主要体现在心肌超微结构损伤明显减轻，心功能明显改善，血清 CK-MB 及 cTnI 含量显著降低[22]。有研究报道 Plumbagin 具有抗炎作用，提示其可能在 CVD 具有潜在的药用价

(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

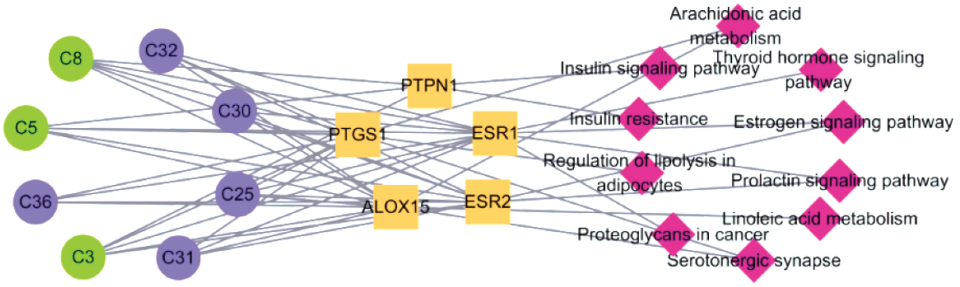


图 5　核心成分-核心靶点-信号通路网络图

Figure 5　Core compound-core target-signal pathway network

值[23]。综上可知，柿叶的主要有效成分具有治疗 CVD 的活性作用，但 4，3'-dihydroxy-α-truxillic acid、α-amyrin 的相关药理活性尚未报道，有必要通过其对应靶点进行深入研究。

本研究发现柿叶作用的核心靶点包括 PTPN1（degree=34）、ALOX15（degree=34）、ESR2（degree=31）、PTGS1（degree=30）、ESR1（degree=30）等。有研究发现 PTPN1 基因单核苷酸多态性（SNP）与血浆 TC 及 LDL-C 水平有关[24]；12/15 脂氧合酶（ALOX）在肥胖症动物模型的炎症介质、胰岛素抵抗和下游免疫激活中起重要作用，而肥胖是 CVD 的主要风险因素[25]；临床研究发现 5-脂氧合酶途径的基因，如 ALOX12、ALOX15、ALOX5 和 ALOX5AP 的多态性与亚临床动脉粥样硬化的生物标志物遗传相关[26]；研究表明 ESR2 的基因多态性与 CVD 之间存在关联[27]；在 FINRISK 研究中发现 ESR1 基因变异可增加冠心病的风险[28]。有研究发现 PTGS1 的遗传多态性可增加非选择性非甾体抗炎药使用者发生急性冠状动脉风险[29]。上述结果也提示了柿叶作用的靶点目前多是从基因多态性角度与 CVD 之间的关联，这种关联的蛋白及信号通路调控有待进一步分析。为此本研究采用在线分析系统 DAVID 进行 KEGG 通路富集分析，发现网络中的核心靶点主要富集在以下 3 个通路，分别为 Prolactin signaling pathway、VEGF signaling pathway 以及 Arachidonic acid metabolism pathway。其中 Prolactin signaling pathway 中的 Prolactin 分子可在氧化应激的作用下裂解成具有抗血管生成和促细胞凋亡的 16 kDa 片段，其可能是引起围产期心肌病的主要原因之一[30]。VEGF 在血管生成中发挥着多种作用，有研究发现雌激素可通过雌激素受体 α 调节 VEGF signaling pathway，并最终调节心脏冠状动脉微血管的发育[31]。目前研究发现 CVD 的发生发展过程均涉及炎症因子的参与，其中 Arachidonic acid metabolism 是重要的炎症通路，许多炎症介质可由 Arachidonic acid metabolism 产生[32]。上述炎症过程在动脉粥样硬化性疾病进展中的作用已明确[33]。最新研究也发现动脉粥样硬化最有前途的干预方向是脂代谢异常和炎症，进一步说明炎症在动脉粥样硬化发生与发展中的重要作用[34]。

为进一步探讨柿叶治疗 CVD 的作用机制，本研究构建了柿叶治疗 CVD 的“核心成分-核心靶点-信号通路”网络，通过对柿叶的核心成分-核心靶点-信号通路的网络分析，结果发现柿叶的核心成分 8 个，可作用于 5 个核心靶点及 10 条通路发挥心血管作用，主要调节的信号通路有 Serotonergic synapse pathway、Insulin resistance pathway、Arachidonic acid metabolism 以及 Prolactin signaling pathway 等。其中 PTPN1、ALOX15、ESR2、PTGS1 及 ESR1 靶点既可作用于 CVD，也可作用于 CVD 并发症及其他疾病并发 CVD。由此建立了柿叶从成分到靶点到信号通路的整合关系，为其下一步作用机制的深入研究提供了依据。

综上所述，本研究基于网络药理学研究方法，通过构建成分-靶点网络、构建靶点-疾病网络、KEGG 通路富集分析、构建核心成分-核心靶点-信号通路等一系列整合网络，从系统层面揭示了柿叶治疗 CVD 的药效物质基础及作用机制，为后续开展实验研究柿叶治疗 CVD 的作用机制提供了思路与线索。

参考文献：

[1] 马丽媛，吴亚哲，王文，等.《中国心血管病报告2017》要点解读[J]. 中国心血管杂志，2018，23(1)：3-6.

[2] BERINSTEIN E，LEVY A. Recent developments and future directions for the use of pharmacogenomics in cardiovascular disease treatments[J]. Expert Opin Drug Metab Toxicol，2017，13(9)：973-983.

[3] 张丽. 高血压患者常见药物不良反应与药物合理应用研究[J]. 中国

(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

老年保健医学，2016，14(1)：63，65.

[4]BRUCKERT E，HAYEM G，DEJAGER S，et al. Mild to moderate muscular symptoms with high-dosage statin therapy in hyperlipidemic patients—The PRIMO Study[J]. Cardiovascular Drugs and Therapy，2005，19(6)：403-414.

[5] INOUE S，TAKAMATSU N，KISHI Y . [Synthetic studies on echinulin and related natural products. III. A total synthesis of neoechinulin (author's transl)] [J]. Yakugaku Zasshi Journal of the Pharmaceutical Society of Japan，1977，97(5)：576-581.

[6] CHEN G，XU S X，WANG H Z，et al. Kakispyrol，a new biphenyl derivative from the leaves of Diospyros kaki[J]. Journal of Asian Natural Products Research，2005，7(3)：265-268.

[7] RUTH M L H，PAOLA Q R P，ANA A，et al. Polyphenolic profile of persimmon leaves by high resolution mass spectrometry (LC-ESI-LTQ- Orbitrap- MS) [J]. Journal of Functional Foods，2016，23：370-377.

[8] 梁催，符福民，张昆山，等. 柿叶对心血管系统的药理作用[J]. 中国药学杂志，1985，20(4)：245.

[9] 余云真，于中原，郭进. 脑心宁治疗缺血性脑血管病的实验与临床观察[J]. 解放军医学杂志，1988，(1)：30.

[10] 广若. 用柿叶对付心脑血管病[J]. 白云医药，2003(2)：31.

[11] HOPKINS A L. Network pharmacology.[J]. Nature Biotechnology，2007，25(10)：1110-1111.

[12] 郑子安，刘铁钢，万宇翔，等. 基于网络药理学方法对两组对药作用机制的对比研究[J]. 中华中医药杂志，2017，32(10)：4386-4389.

[13] 蔡甜甜，潘华峰，王奇，等. 中药复方在病证基础上的网络药理学研究[J]. 中华中医药杂志，2016，31(11)：4746-4748.

[14] YAO Z J，DONG J，CHE Y J，et al. TargetNet：a web service for predicting potential drug-target interaction profiling via multi-target SAR models[J]. Journal of Computer- Aided Molecular Design，2016，30(5)：1-12.

[15] 广西壮族自治区卫生厅. 广西中药材标准1990版[M]. 广西：广西科学技术出版社，1992：70-71.

[16] 李娜，周志宏. 柿的药学研究概况[J]. 中国民族民间医药，2015，24(16)：40-43.

[17] 欧阳平，贝伟剑，赖文岩，等. 柿叶黄酮对缺氧复氧以及晚期糖基化终产物诱导的乳鼠心肌细胞凋亡的影响[J]. 南方医科大学学报，2003，23(7)：680-682.

[18] 邓瑞春，张文生，杨洪军，等. 柿叶乙醇提取物治疗大鼠高脂血症的实验研究[J]. 中国中医药信息杂志，2004，11(6)：493-494.

[19] SUCHAL K，MALIK S，KHAN S，et al. Molecular pathways involved in the amelioration of myocardial injury in diabetic rats by kaempferol[J]. International Journal of Molecular Sciences，2017，18(5)：1001-1017.

[20] CHEN K，REKEP M，WEI W，et al. Quercetin prevents in vivo and in vitro myocardial hypertrophy through the proteasome-gsk-3 pathway[J]. Cardiovascular Drugs & Therapy，2018，32(4)：1-17.

[21] YINGNA Q，NING C，MENG L，et al. Systems pharmacology dissection of the protective effect of myricetin against acute ischemia/reperfusion- induced myocardial injury in isolated rat heart[J]. Cardiovascular Toxicology，2017，17(3)：277-286.

[22] 马同强，燕子，李雯，等. 蛇床子素后处理对大鼠心肌急性缺血/再灌注损伤的保护作用[J]. 中国心血管病研究，2012，10(5)：385-388.

[23] PANICHAYUPAKARANANT P，AHMAD M I . Plumbagin and its role in chronic diseases[J]. Oxygen Transport to Tissue XXXIII，2016，9(29)：229-246.

[24] BAUER F，CHARLOTTE O M N，NIEHOFF A G，et al. PTPN1 polymorphisms are associated with total and low-density lipoprotein cholesterol[J]. European Journal of Cardiovascular Prevention & Rehabilitation，2010，17(1)：28-34.

[25] DOBRIAN A D，LIEB D C，MA Q，et al. Differential expression and localization of 12/15 lipoxygenases in adipose tissue in human obese subjects[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications，2010，403(3-4)：485-490.

[26] BURDON K P，RUDOCK M E，LEHTINEN A B，et al. Human lipoxygenase pathway gene variation and association with markers of subclinical atherosclerosis in the diabetes heart study[J]. Mediators of Inflammation，2010，(2010)：1-9.

[27] REXRODE K M，RIDKER P M，HEGNER H H，et al. Polymorphisms and haplotypes of the estrogen receptor- β gene (ESR2) and cardiovascular disease in men and women[J]. Clinical Chemistry，2007，53(10)：1749-1756.

[28] KUNNAS T，SILANDER K，KARVANEN J，et al. ESR1 genetic variants，haplotypes and the risk of coronary heart disease and ischemic stroke in the Finnish population：a prospective follow-up study[J]. Atherosclerosis，2010，211(1)：200-202.

[29] GERMAINE C G S，BOGATY P，BOYER L，et al. Genetic polymorphisms and the cardiovascular risk of non- steroidal anti-inflammatory drugs[J]. American Journal of Cardiology，2010，105(12)：1740-1745.

[30] 孟一迪，卢永昕，帅欣欣. 催乳素抑制剂——治疗围产期心肌病的新靶点[J]. 临床心血管病杂志，2014(4)：278-281.

[31] JESMIN S，MOWA C N，SULTANA S N，et al. VEGF signaling is disrupted in the hearts of mice lacking estrogen receptor alpha[J]. European Journal of Pharmacology，2010，641(2-3)：168-178.

[32] 陶迎秋，梁统，周克元. 花生四烯酸三条代谢通路在炎症反应中的作用[J]. 国际免疫学杂志，2010，33(4)：303-306.

[33] YU E，HSU H Y，HUANG C Y，et al. Inflammatory biomarkers and risk of atherosclerotic cardiovascular disease[J]. Open Medicine，2018，13(1)：208-213.

[34] 李建军. 心血管病进展与2011回顾炎症与冠状动脉粥样硬化性疾病研究进展[J]. 心血管病学进展，2012，33(1)：10-13.

（编辑：修春）

(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net