

基于网络药理学结合 GEO 数据库多芯片联合分析探讨化橘红防治动脉型肺动脉高压的分子作用机制

袁崧展^{1,3}, 谢锦程^{1,3}, 肖梦媛¹, 邓少东^{2,3*}, 陈建英^{1*}

1. 广东医科大学附属医院, 广东 湛江 524001

2. 广东医科大学附属东莞第一医院, 广东 东莞 523710

3. 广东医科大学 第二临床医学院科研平台, 广东 东莞 523808

摘要: 目的 采用网络药理学结合 GEO 数据库多芯片联合分析及分子对接的方法研究化橘红防治动脉型肺动脉高压的潜在分子作用机制。方法 利用 TCMSP、ETCM、Swiss Target Prediction 和 PharmMapper 等数据库结合文献报道, 获取化橘红活性成分的作用靶点。通过 GEO 数据库多芯片联合分析获得动脉型肺动脉高压的差异表达基因, 联合 GeneCard、DisGeNET 和 DiGSeE 等数据库筛选出动脉型肺动脉高压的潜在疾病基因。对疾病基因和活性成分靶点取交集, 以 Cytoscape 3.7.2 软件构建化橘红活性成分-靶点的可视化网络。基于 String 数据库, 构建化橘红防治动脉型肺动脉高压靶点的蛋白互作 (PPI) 网络, 分析筛选出核心靶点, 进行基因本体 (GO) 功能富集分析和京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 信号通路富集分析, 构建化橘红活性成分-靶点-信号通路网络。将化橘红主要活性成分与网络拓扑分析后所得到的排名前 10 的核心靶点进行分子对接, Autodock Vina 预测其分子结合自由能及 Pymol 作分子对接可视化图。结果 筛选出活性成分 15 个, 得到可作用于动脉型肺动脉高压的靶点 150 个, 核心靶点涉及肿瘤蛋白 P53 (TP53)、 β -肌动蛋白 (ACTB)、肿瘤坏死因子 (TNF)、血管内皮生长因子 A (VEGFA)、丝裂原活化蛋白激酶 3 (MAPK3)、缺氧诱导因子-1 α (HIF1A) 和胱天蛋白酶 3 (CASP3) 等。GO 富集分析得到生物学过程相关条目 572 条、分子功能相关条目 115 条及细胞组分相关条目 84 条 ($P < 0.01$)。KEGG 通路富集分析得到 173 条信号通路 ($P < 0.01$), 主要涉及癌症通路、脂质与动脉粥样硬化通路、流体剪切应力与动脉粥样硬化、细胞衰老、缺氧诱导因子-1 (HIF-1) 信号通路、磷酸酰肌醇-3-激酶 (PI3K)-蛋白激酶 B (Akt) 信号通路、白细胞介素-17 (IL-17) 信号通路和细胞凋亡等。分子对接结果表明关键成分和关键靶点间均具有较好的结合活性。结论 化橘红通过多靶点、多通路发挥治疗动脉型肺动脉高压的作用。

关键词: 化橘红; 动脉型肺动脉高压; 网络药理学; GEO 数据库; 分子对接; 靶点; 肿瘤蛋白 P53; 血管内皮生长因子 A
中图分类号: R925.5 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2023)05-1028-13

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2023.05.002

To explore the mechanism of action of pulmonary arterial hypertension curing by *Citri Grandis Exocarpium* based on network pharmacology combined with multi-chip analysis of GEO database

YUAN Song-zhan^{1,3}, XIE Jin-cheng^{1,3}, XIAO Meng-yuan¹, DENG Shao-dong^{2,3}, CHEN Jian-ying¹

1. Affiliated Hospital of Guangdong Medical University, Zhanjiang 524001, China

2. The First Dongguan Affiliated Hospital, Guangdong Medical University, Dongguan 523710, China

3. Scientific Research Platform, The Second Clinical Medical College of Guangdong Medical University, Dongguan 523808, China

Abstract: Objective To investigate the potential molecular mechanism of action of *Citri Grandis Exocarpium* in the prevention and treatment of pulmonary arterial hypertension by using network pharmacology combined with GEO database multi-chip analysis and

收稿日期: 2023-01-15

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (81370242); 广东医科大学学科建设项目 (4SG21229GDGFY01); 广东医科大学校级大学生创新创业训练计划项目 (GDMU2021117, GDMU2021156); 湛江市非资助科技攻关计划项目 (2021B01145); 湛江市科技计划项目 (2022A01183)

作者简介: 袁崧展 E-mail: yszgdy1039@163.com

***通信作者:** 陈建英 E-mail: jyichen271@126.com

邓少东 E-mail: dengshaodong@gdmu.edu.cn

molecular docking method. **Methods** TCMSP, ETCM, Swiss Target Prediction, PharmMapper and other databases were used to obtain the targets of the active ingredients of *Citri Grandis Exocarpium* in combination with literature reports. The differentially expressed genes of arterial pulmonary hypertension were obtained by multi-chip analysis of GEO database, and the potential disease genes of arterial pulmonary hypertension were screened by combining with GeneCard, DisGeNET, and DiGSeE databases. The intersection of the disease genes and the active ingredient targets was taken, and the Cytoscape 3.7.2 software was used to construct the visualization network of the active ingredient-targets of *Citri Grandis Exocarpium*. Based on the String database, the protein interactions network of the targets of *Citri Grandis Exocarpium* for the prevention and treatment of arterial pulmonary hypertension was constructed, the core targets were analyzed and screened, GO functional enrichment analysis and KEGG signaling pathway enrichment analysis were performed, and the active ingredient-target-signaling pathway network of *Citri Grandis Exocarpium* was constructed. The molecular docking was performed between the top ten active ingredients and the core targets obtained from the network topology analysis, and the molecular binding free energy was predicted by Autodock Vina and visualized by Pymol. **Results** 15 active ingredients were screened, and 150 targets were identified for arterial pulmonary hypertension, including TP53, ACTB, TNF, VEGFA, MAPK3, HIF1A, CASP3, etc. GO enrichment analysis yielded 572 entries related to biological processes, 115 entries related to molecular functions, and 84 entries related to cellular components ($P < 0.01$). KEGG pathway enrichment analysis yielded 173 signaling pathways ($P < 0.01$), mainly involving cancer pathway, lipid and atherosclerosis pathway, fluid shear stress and atherosclerosis, cellular senescence, HIF-1 signaling pathway, PI3K-Akt signaling pathway, IL-17 signaling pathway, and apoptosis. The molecular docking results showed good binding activity between key components and key targets. **Conclusion** *Citri Grandis Exocarpium* exerts its effect on the treatment of arterial pulmonary hypertension through multi-target and multi-pathway. **Key words:** *Citri Grandis Exocarpium*; pulmonary arterial hypertension; network pharmacology; GEO database; molecular docking; target; TP53; VEGFA

动脉型肺动脉高压 (PAH) 是由多种因素引起, 造成肺循环阻力升高、肺动脉压力增高的临床综合征, 最终可导致右心衰竭甚至死亡, 具有较高的致死率和不良预后, 对人类健康造成威胁^[1]。目前临床常用于治疗 PAH 的药物主要包括钙离子通道阻滞剂 (CCB)、内皮素受体拮抗剂 (ETRA) 和鸟苷酸环化酶 (sGC) 刺激剂等, 这些药物可一定程度上改善 PAH 症状并延缓疾病进展, 但无法逆转病情, 且具有一定不良反应, 长期预后较差^[2]。因此, 亟需开发安全有效的治疗药物。

化橘红为芸香科植物化州柚 *Citrus grandis* Tomentosa 或柚 *C. grandis* (L.) Osbeck 的未成熟或近成熟的干燥外层果皮, 性温, 味辛、苦, 归肺、脾经, 具有散寒燥湿、利气消痰和止咳等功效^[3]。目前已有大量的研究表明, 化橘红中含有的多种活性成分, 如柚皮苷、柚皮素、芹菜素等黄酮类以及挥发性成分, 具有保护血管内皮细胞、调节血管舒张功能、抑制不良血管重塑、抗炎等作用^[4-10], 可有效降低实验动物心血管不良事件的发生及改善预后。中医药治疗 PAH 常以理气、化痰、止咳平喘等功效的药物为主, 而化橘红在这些方面均具有功效。同时, 药理研究表明化橘红中含有的多种活性成分, 对 PAH 的相关实验模型均有显著改善作用, 但其作用机制不明。因此, 本文采用网络药理学结合 GEO 数

据库多芯片联合分析的研究方法, 从中药多成分、多靶点和多通路等角度预测化橘红防治 PAH 的潜在活性成分以及作用机制, 以期为后续的实验研究提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 化橘红化学成分的收集及活性成分的筛选

采用中药系统药理学数据库与分析平台数据库 (TCMSP, <http://tcmspw.com/tcmsp.php/>) 收集化橘红药的化学成分, 以口服生物利用度 (OB) $\geq 30\%$ 、类药性 (DL) ≥ 0.18 作为筛选标准, 筛选出化橘红的主要活性成分^[11]。

1.2 化橘红活性成分潜在作用靶点的预测

通过 TCMSP 数据库及中医药百科全书平台数据库 (ETCM, <http://www.tcmip.cn/ETCM/index.php/Home/Index/>), 同时采用 Swiss Target Prediction 数据库 (<http://www.swisstargetprediction.ch/>)、PharmMapper 分析平台 (<http://www.lilab-ecust.cn/pharmmapper/>) 对活性成分靶点进行进一步补充, 具体方法为基于 Pubchem 数据库 (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>), 对化橘红的活性成分进行检索, 获得各成分的 SMILES 化学式, 并将各成分的 SMILES 信息输入 Swiss Target Prediction、PharmMapper 分析平台预测化橘红主要活性成分对应的潜在作用靶点, 在 UniProt 数据库 (<https://>

www.uniprot.org/) 将所得靶点名称进行标准化, 即得药物潜在的作用靶点。

1.3 基因芯片及差异表达基因筛选

在 GEO 数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) 中以“pulmonary arterial hypertension”为关键词检索与 PAH 相关的基因表达谱数据, 并将“Organism”设置为“Homo sapiens”来查找符合条件的基因芯片数据集, 在 HOME for Researchers 平台(<https://www.aclbi.com/static/index.html#/>) 对所查找到的基因芯片统一进行 Log 化处理。将筛选所得的各基因芯片的差异基因进行并集、去重, 筛选出 PAH 的相关芯片预测基因。

1.4 疾病潜在作用靶点的筛选及药物-疾病共同作用靶点的获取

分别在 GeneCards (<https://www.genecards.org/>)、DisGeNET (<https://www.disgenet.org/>)、DiGSeE (<http://210.107.182.61/geneSearch/>) 等数据库中检索与 PAH 相关的基因, 对收集的疾病基因进行筛选, 将筛选得到的基因导入 UniProt 数据库进行标准化处理、汇总后将多余重复的基因删除, 将这部分基因与上述 GEO 芯片筛选的基因进行并集、去重后, 即得 PAH 相关基因。将化橘红活性成分靶点与 PAH 相关的基因导入 Venny 在线作图软件(<https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/>) 取交集, 即得药物-疾病共同作用靶点。

1.5 化橘红活性成分-共同作用靶点网络的构建

运用 Cytoscape 3.7.2 软件绘制并构建“活性成分-共同作用靶点”的关系网络, 将化橘红活性成分与药物-疾病共同作用靶点进行关联, 并进行拓扑学参数分析, 根据连接度(degree)、紧密度(CC)以及介度(BC)的中位数来筛选出成分-靶点网络的核心节点。

1.6 蛋白互相作用(PPI)网络构建

将化橘红防治 PAH 的靶点导入 String 数据库(<https://www.string-db.org/>) 中, 选择 medium confidence=0.400 作为最小互作分数, 对其进行 PPI 网络分析, 删除孤立的蛋白, 得到 PPI 网络分析数据并将其导入 Cytoscape 3.7.2 中, 构建 PPI 网络进行可视化, 重新构建核心靶点的 PPI 网络图。

1.7 基因本体(GO)功能富集分析和京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路富集分析

为了进一步探究化橘红防治 PAH 中可能涉及的分子过程、生物学过程、信号通路以及活性成分

等, 将化橘红中活性成分与疾病的交集靶点上传至 David 分析平台(<https://david.ncifcrf.gov/>), 进行 GO 富集分析和 KEGG 通路分析, 以气泡图可视化进行展现。

1.8 活性成分-共同作用靶点-信号通路的网络构建

根据 KEGG 通路分析结果, 参考现有的研究成果以及生物学信息筛选出其中可能与 PAH 有关的信号通路, 找出富集在这些通路上的潜在作用靶点, 并与相应的活性成分相对应, 以 Cytoscape 3.7.2 软件绘制“活性成分-共同作用靶点-信号通路”网络关系图。

1.9 分子对接技术预测化橘红活性成分与潜在靶点的结合能力

在化学数据库(PubChem, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) 与蛋白质数据库(RCSB-PDB) (<http://www.rcsb.org/>) 中检索核心成分靶点与配体文件, 获取核心药物成分结构并保存为 mol2 格式。使用 Autodock tools 软件对蛋白加氢、计算电荷等处理, 识别蛋白结合位点并计算出对接口袋大小, 再通过 AutoDock Vina 程序计算分子对接预测结合自由能。完成上述步后, 使用 Autodock 软件对蛋白靶点与化橘红核心成分进行对接, 选取配体-受体具有良好亲和力的结合构象于 Pymol 展示 3D 对接示意图及对接分子口袋图。

2 结果

2.1 化橘红药的主要活性成分

通过 TCMSP 数据库检索出化橘红化学成分 44 个, 以 $OB \geq 30\%$ 、 $DL \geq 0.18$ 为筛选标准, 筛选出化橘红的主要活性成分 10 个, 结合相关文献报道, 增加野漆树苷、西托糖苷、芹菜素、柚皮苷和橘皮素 5 个活性成分^[6, 12-13], 共得到化橘红的主要活性成分 15 个, 见表 1。

2.2 化橘红活性成分作用靶点预测

通过 TCMSP 数据库检索表 1 各活性成分的作用靶点, 获得靶点共 194 个, 在 ETCM 数据库搜索获得相关靶点 96 个, 发现 S2、S7、S10、S11、S13、S14、S15 等 7 个活性成分没有收录或只收录了较少的作用靶点, 为此采用 Pubchem 数据库获得 SMILES, 然后通过 Swiss Target Prediction、PharmMapper 分析平台预测以上 7 个活性成分的相关作用靶点。剔除仍无相关靶点信息的 S15, 共得作用靶点 866 个, 通过 Uniprot 数据库进行标准化处理, 取并集、去重后得到 411 个作用靶点。

表 1 化橘红的主要活性成分

Table 1 Main active ingredients of *Citri Grandis Exocarpium*

编号	成分 ID	活性成分	OB/%	DL
S1	MOL013279	三甲基芹菜素	39.83	0.30
S2	MOL013276	枸橼苷	36.55	0.74
S3	MOL000358	β -谷甾醇	36.91	0.75
S4	MOL005849	香风草苷	38.55	0.24
S5	MOL001803	甜橙黄酮	50.56	0.45
S6	MOL013277	异橙黄酮	51.15	0.44
S7	MOL004328	柚皮素	59.29	0.21
S8	MOL005828	川陈皮素	61.67	0.52
S9	MOL001798	新橙皮苷	71.17	0.27
S10	MOL000010	野漆树苷	6.68	0.77
S11	MOL000357	西托糖苷	20.63	0.62
S12	MOL000008	芹菜素	23.06	0.21
S13	MOL005812	柚皮苷	6.92	0.78
S14	MOL005814	橘皮素	21.38	0.43
S15	MOL010267	番茄红素	32.57	0.51

2.3 基因芯片及差异表达基因筛选

从 GEO 数据库中筛选获取到基因芯片 GSE113439、GSE69416 和 GSE117261。利用 Rstudio 的 limma R 软件包对全部样本进行分析,得到 4 490 个差异基因,其中上调基因 3 260 个,下调基因 1 230 个,后进行合并、删除重复项后得到 4 041 个差异基因,筛选所得差异基因即为 PAH 相关的基因,见图 1。

2.4 疾病潜在作用靶点的筛选及药物-疾病共同作用靶点的获取

通过检索 GeneCard、DisGeNET 和 DiGSeE 数据库收集 PAH 相关作用靶点,经合并去重后获得相关的疾病靶点 218 个。将基因芯片预测的靶点与上述疾病数据库的相关靶点进行合并、去重后,得到 4 187 个相关靶点,将其与药物活性成分靶点取交集后获得化橘红与 PAH 共有作用靶点 150 个,并绘制韦恩图,见图 2。

2.5 化橘红活性成分-共同作用靶点网络的构建与分析

将化橘红活性成分、药物-疾病的共同作用靶点导入 Cytoscape 3.7.2 软件,构建活性成分-共同作用靶点网络,见图 3。在网络图中,椭圆形节点代表药物成分,菱形节点代表共同作用靶点,共 164 个节点(包括 14 个活性成分节点和 150 个靶点节

点)和 322 条边。每条边表示化合物分子与靶点之间的相互作用关系。利用 Network Analyzer 程序计算该活性成分-靶点网络拓扑学参数,以图表形式显示 14 个活性成分的拓扑学分析参数,见表 2。可见作用于靶点数量较多的前 9 种活性成分分别为芹菜素、柚皮素、野漆树苷、枸橼苷、 β -谷甾醇、川陈皮素、异橙黄酮、柚皮苷和橘皮素,分别靶向 79、56、33、19、19、19、15、15、15 个与 PAH 相关的基因位点。这些 degree 值较高的关键靶点有可能在治疗 PAH 中发挥着重要作用。

2.6 化橘红治疗 PAH 的核心靶点分析

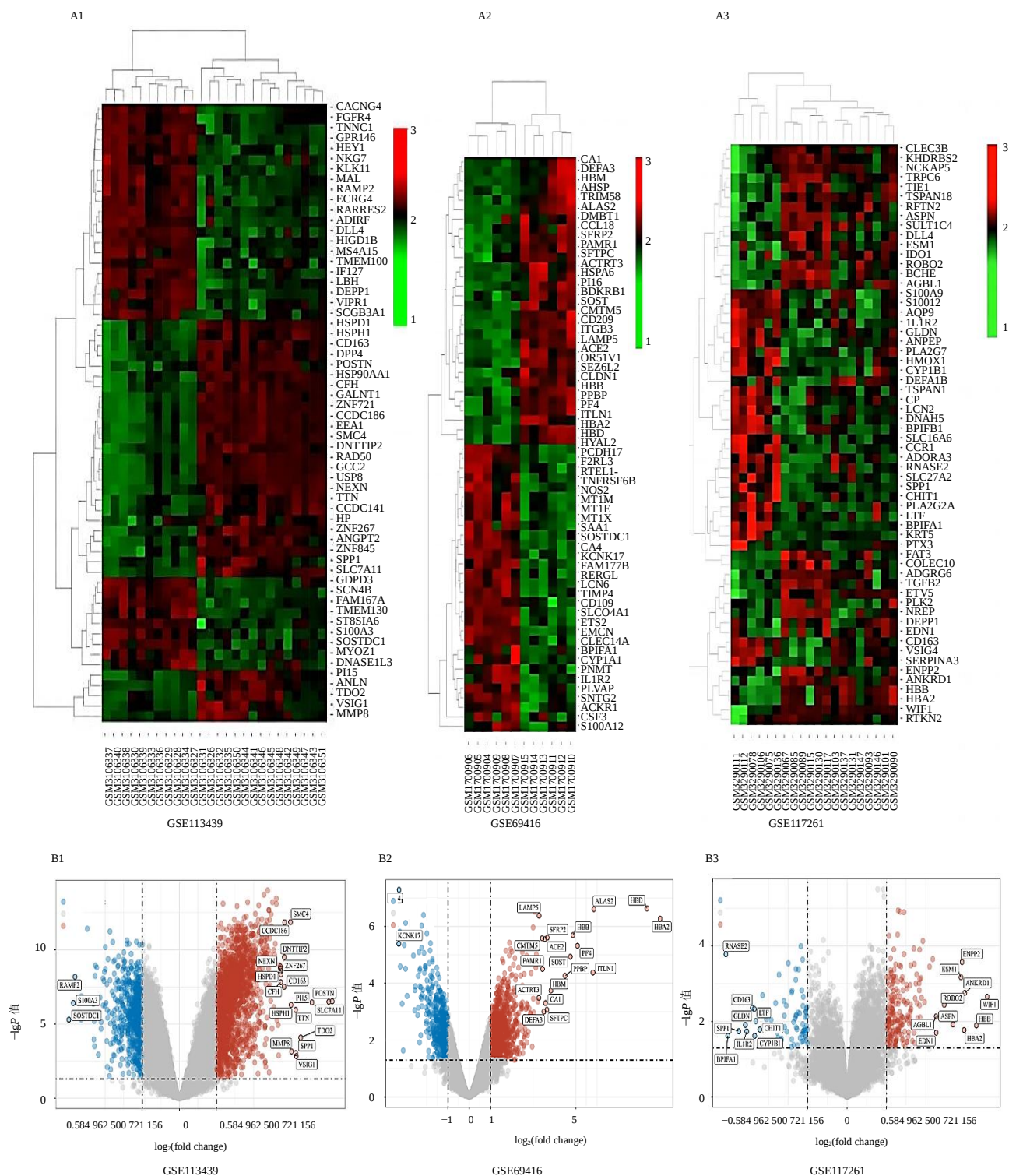
将 150 个共同靶点导入 String 数据库中,构建 PPI 网络模型(图 4),去除孤立的节点 3 个,导出 PPI 网络分析数据。利用 Cytoscape 3.7.2 软件分析 PPI 网络分析数据,根据靶点的 degree 值正相关设置节点体积及颜色(degree 值由小及大对应节点颜色由冷色及暖色),根据靶点的连接系数正相关设置连线粗细及颜色(连接系数值由小及大对应节点颜色由冷色及暖色),见图 5,根据 $BC \geq 0.002\ 432\ 97$ 、 $CC \geq 0.473\ 684\ 21$ 以及 $degree \geq 16$ (中位数)等拓扑学参数条件筛选出 53 个核心靶点,见表 3。degree 值大即表示该靶点处于网络的核心地位,所筛选出的 53 个核心靶点在化橘红治疗 PAH 的调控过程中可能起着关键作用。

2.7 GO 功能富集分析

GO 富集分析得到生物学过程(BP)相关条目 572 条、分子功能(MF)相关条目 115 条及细胞组分(CC)相关条目 84 条($P < 0.01$)。分别以 P 值筛选条目,通过 Bioinformatics 微生信作图平台(<https://www.bioinformatics.com.cn/>)作气泡图,见图 6。从结果可看出,化橘红参与治疗 PAH 的 BP 主要富集在对药物的反应(response to drug)、对异生刺激的反应(response to xenobiotic stimulus)和对缺氧的反应(response to hypoxia)等方面,MF 主要富集在酶结合(enzyme binding)、同种蛋白结合(identical protein binding)和蛋白结合(protein binding)等方面,CC 主要富集在质膜(plasma membrane)、高分子复合物(macromolecular complex)和细胞外区(extracellular region)等方面。

2.8 KEGG 通路分析

通过 KEGG 信号通路分析,共富集得到 173 条相关信号通路($P < 0.01$)。其中与 PAH 相关的通路主要包括癌症通路(pathways in cancer)、脂质与动



A1、A2 和 A3 为差异表达显著的排名前 50 基因的热图，B1、B2 和 B3 为相关基因在 PAH 患者和健康对照者之间分布的火山图，上调的基因用红点标记（图右边），下调的基因用蓝点标记（图左边）

A1, A2 and A3 were heat maps of the top 50 genes with significant differentially expressed expression; B1, B2 and B3 were volcano maps of the distribution of related genes between PAH patients and healthy controls. Up-regulated genes were labeled with red dots (right of the picture), while down-regulated genes were labeled with blue dots (left of the picture)

图 1 各基因芯片中差异基因表达分析及排名前 50 的差异表达基因热图

Fig. 1 Analysis of differentially expressed genes in each microarray and heat map of differentially expressed genes in top 50

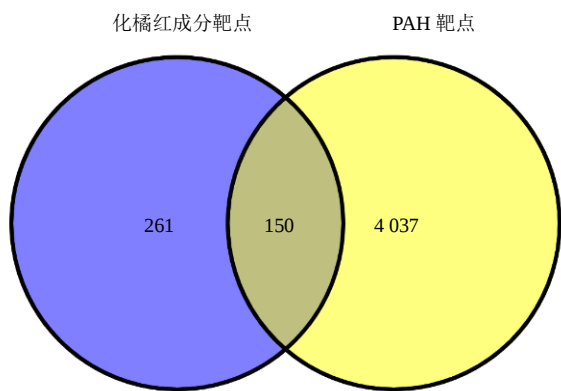


图 2 药物与疾病共有作用靶点韦恩图

Fig. 2 Venn diagram of the common target of drug and disease

脉粥样硬化通路 (lipid and atherosclerosis)、流体剪切应力与动脉粥样硬化 (fluid shear stress and atherosclerosis)、AGE-RAGE 信号通路在糖尿病并发症中的作用 (AGE-RAGE signaling pathway in diabetic complications)、细胞衰老 (cellular senescence)、HIF-1 信号通路 (HIF-1 signaling pathway)、PI3K-Akt 信号通路 (PI3K-Akt signaling pathway)、雌激素信号通路 (estrogen signaling pathway)、松弛素信号通路 (relaxin signaling pathway)、IL-17 信号通路 (IL-17 signaling pathway)、细胞凋亡 (apoptosis), 见图 7。提示化橘红可能通过作用以上多条通路来发挥治疗 PAH 的作用。

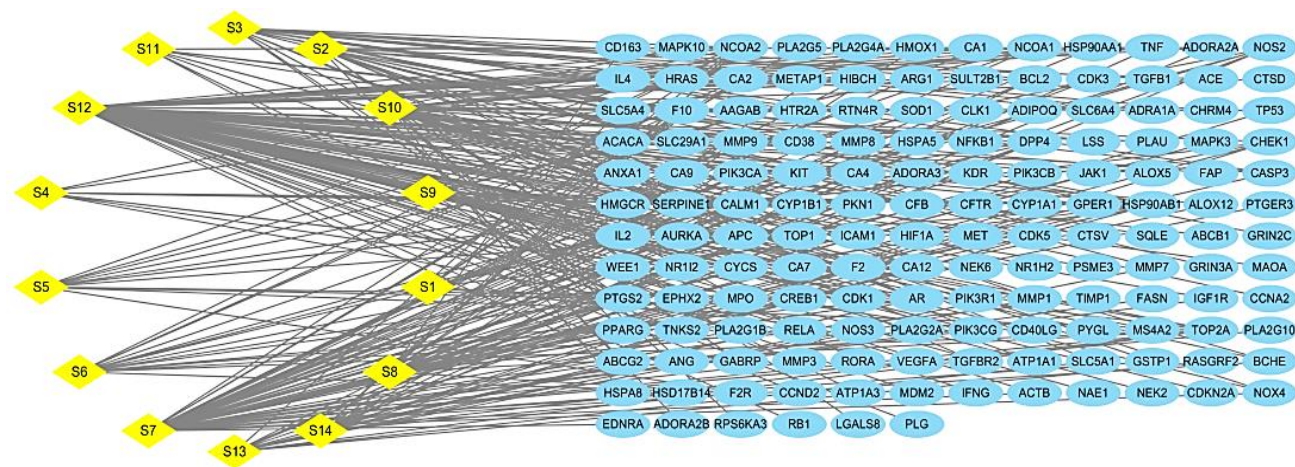


图 3 化橘红活性成分 - 共同作用靶点网络

Fig. 3 Network diagram of the main active ingredient targets of *Citri Grandis Exocarpium*

表 2 化橘红主要活性成分 - 靶点网络中各节点的拓扑学参数

Table 2 Network characteristics of all components in *Citri Grandis Exocarpium*-target network nodes

编号	活性成分	介数中心度	接近中心度	degree 值
S12	芹菜素	0.509 164 70	0.512 578 620	79
S7	柚皮素	0.298 705 41	0.447 802 20	56
S10	野漆树苷	0.185 620 86	0.393 719 81	33
S2	枸橼苷	0.092 294 84	0.363 839 29	19
S3	β -谷甾醇	0.133 067 08	0.372 146 12	19
S8	川陈皮素	0.064 873 17	0.372 146 12	19
S6	异橙黄酮	0.019 296 89	0.365 470 85	15
S13	柚皮苷	0.046 366 94	0.363 839 29	15
S14	橘皮素	0.038 266 11	0.365 470 85	15
S5	甜橙黄酮	0.009 186 22	0.360 619 47	12
S11	西托糖苷	0.050 722 27	0.349 785 41	11
S4	香风草苷	0.003 445 27	0.335 390 95	10
S9	新橙皮苷	0.003 445 27	0.335 390 95	10
S1	三甲基芹菜素	0.006 122 13	0.352 813 85	9

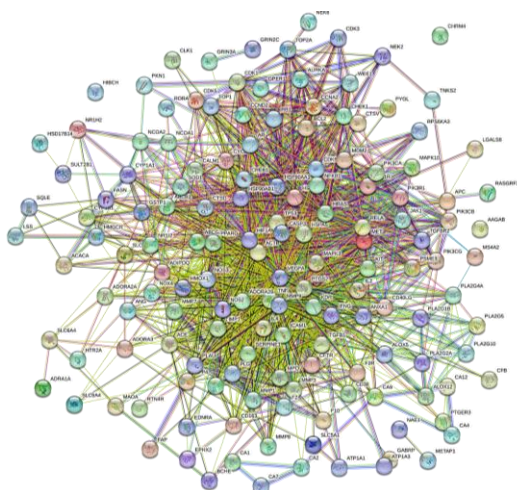


图 4 化橘红治疗 PAH 靶蛋白 PPI 网络图

Fig. 4 PPI network diagram of PAH target protein treated by *Citri Grandis Exocarpium*

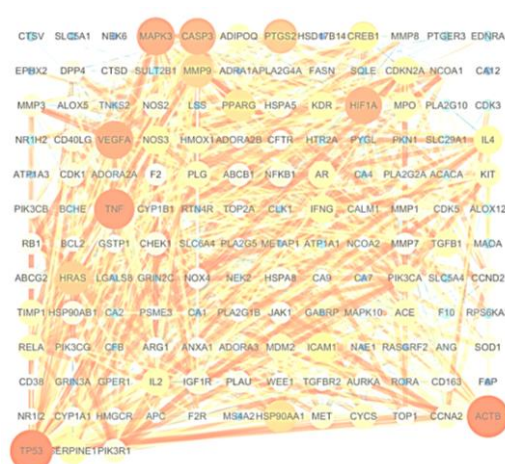


图 5 化橘红治疗 PAH 靶蛋白 PPI 网络图

Fig. 5 PPI network diagram of PAH target protein treated by *Citri Grandis Exocarpium*

表 3 核心靶点的拓扑学参数分析

Table 3 Analysis of topological parameters of core target

核心靶点	介数中心度	接近中心度	degree 值	核心靶点	介数中心度	接近中心度	degree 值
TP53	0.086 275 24	0.695 652 17	86	ACE	0.018 589 04	0.537 313 43	35
ACTB	0.078 209 82	0.685 714 29	85	TIMP1	0.009 510 43	0.525 547 45	35
TNF	0.087 436 89	0.669 767 44	79	RELA	0.003 145 17	0.531 365 31	34
VEGFA	0.043 078 40	0.634 361 23	73	CYCS	0.012 717 93	0.533 333 33	33
MAPK3	0.063 339 02	0.634 361 23	72	KIT	0.002 759 85	0.514 285 71	32
HIF1A	0.050 550 35	0.626 086 96	69	ADIPOQ	0.007 773 96	0.525 547 45	32
CASP3	0.027 946 46	0.628 820 96	68	NFKB1	0.003 624 78	0.521 739 13	29
PTGS2	0.037 643 92	0.605 042 02	61	NOS2	0.010 658 55	0.510 638 30	29
HRAS	0.049 732 72	0.602 510 46	60	HSPA5	0.006 532 86	0.529 411 76	28
MMP9	0.037 363 01	0.597 510 37	58	PIK3R1	0.005 444 59	0.500 000 00	28
HSP90AA1	0.025 825 89	0.597 510 37	55	HSP90AB1	0.003 460 89	0.517 98561	27
PPARG	0.033 127 94	0.590 163 93	54	CCNA2	0.010 497 69	0.510 638 30	27
ICAM1	0.005 997 64	0.558 139 53	46	CDK1	0.007 431 77	0.488 135 59	27
CREB1	0.052 451 40	0.562 500 00	46	CHEK1	0.003 075 41	0.488 135 59	26
NOS3	0.009 956 49	0.560 311 28	43	ABCB1	0.013 742 23	0.508 833 92	25
IL-4	0.012 714 39	0.549 618 32	43	HSPA8	0.003 925 31	0.500 000 00	24
IFNG	0.004 263 84	0.547 528 52	41	F2	0.005 296 38	0.489 795 92	22
CDKN2A	0.007 708 08	0.549 618 32	41	DPP4	0.015 510 40	0.494 845 36	22
KDR	0.006 577 86	0.537 313 43	40	ABCG2	0.003 988 52	0.500 000 00	20
SERPINE1	0.005 262 59	0.535 315 99	39	CTSD	0.003 283 55	0.486 486 49	20
IL2	0.003 844 01	0.547 528 52	39	TOP1	0.004 861 21	0.475 247 52	18
AR	0.015 624 40	0.545 454 55	38	CYP1A1	0.016 244 19	0.488 135 59	18
PIK3CA	0.012 640 01	0.527 472 53	38	CFTR	0.034 505 27	0.483 221 48	18
MPO	0.006 727 80	0.525 547 45	37	ALOX5	0.003 405 12	0.480 000 00	18
MDM2	0.004 964 80	0.539 325 84	37	GSTP1	0.002 823 55	0.473 684 21	16
HMOX1	0.003 938 95	0.531 365 31	36	TGFBR2	0.002 974 68	0.478 405 32	16
PLG	0.011 730 44	0.521 739 13	36				

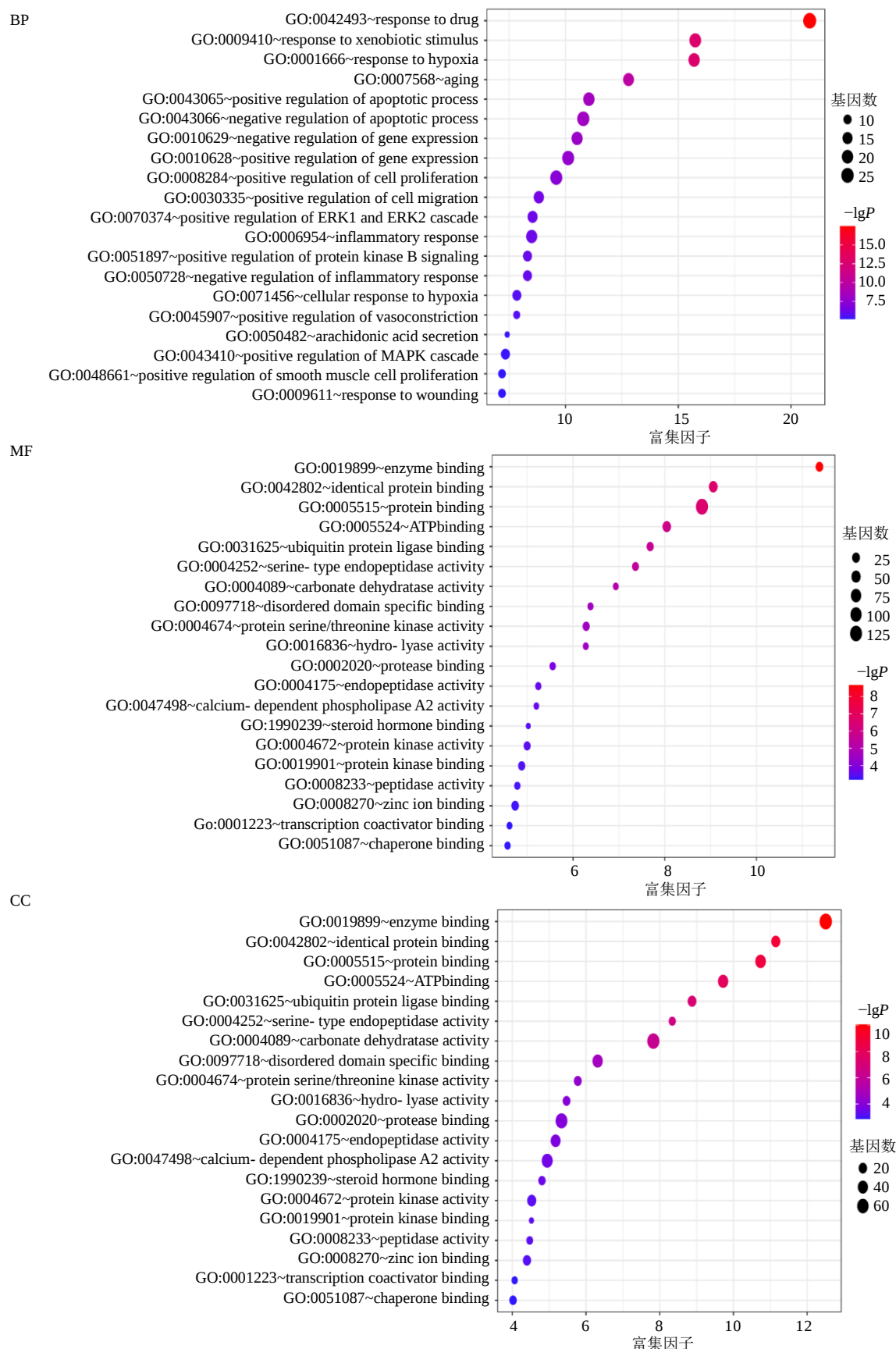


图 6 化橘红治疗 PAH 的 GO 富集分析

Fig. 6 GO enrichment analysis of *Citri Grandis Exocarpium* in treatment of arterial pulmonary hypertension

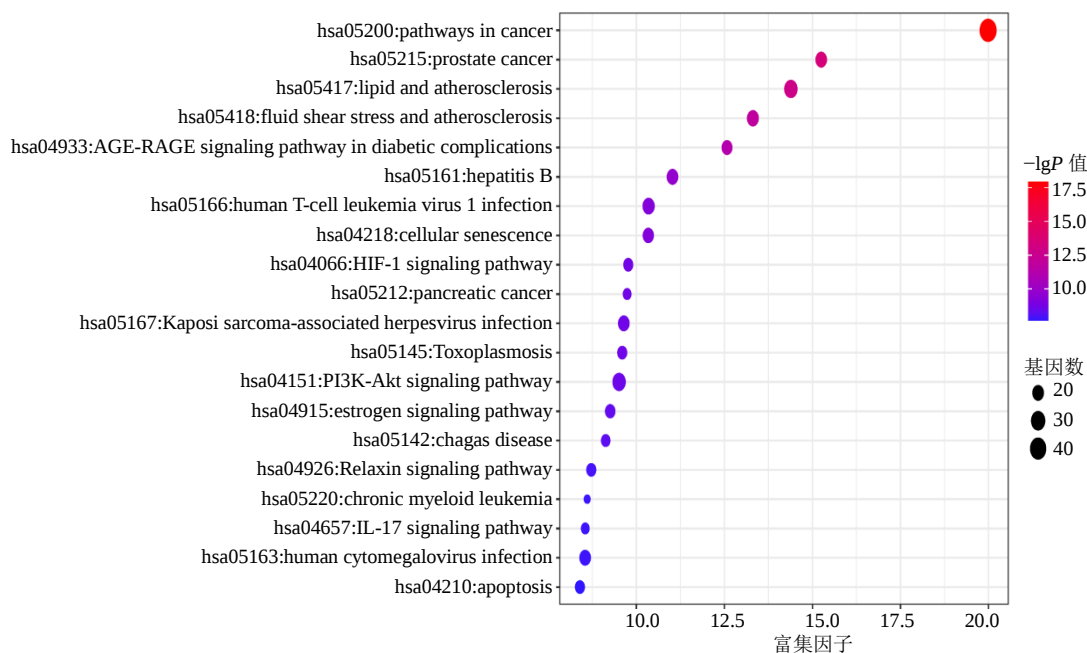


图 7 化橘红治疗 PAH 的 KEGG 通路富集分析

Fig. 7 KEGG pathway enrichment analysis of *Citri Grandis Exocarpium* in treatment of pulmonary arterial hypertension

2.9 化橘红活性成分 - 共同作用靶点 - 信号通路的网络构建

化橘红“活性成分 - 共同作用靶点 - 信号通路”网络见图 8, 其中椭圆形节点代表活性成分、菱形

节点代表作用靶点、长方形节点代表信号通路。化橘红共有 14 个活性成分、150 个作用靶点, 分布于 11 条不同的 PAH 相关信号通路中, 体现了化橘红多成分、多靶点治疗 PAH 的作用机制。

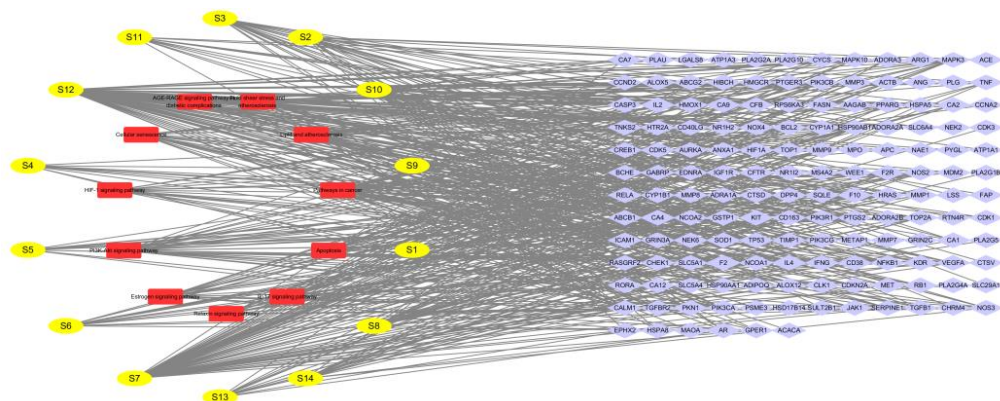


图 8 化橘红“活性成分 - 共同作用靶点 - 信号通路”网络关系图

Fig. 8 Component-target-pathway network of *Citri Grandis Exocarpium*

2.10 分子对接技术预测化橘红活性成分与潜在靶点的结合能力

根据“疾病 - 活性成分 - 靶点”网络分析得到核心活性成分有芹菜素、柚皮素、野漆树苷、枸橼苷、 β -谷甾醇、川陈皮素、异橙黄酮、柚皮苷、橘皮素、甜橙黄酮, 与关键靶点肿瘤蛋白 P53 (TP53)、 β -肌动蛋白 (ACTB)、肿瘤坏死因子 (TNF)、血管内皮生长因子 A (VEGFA)、丝裂原活化蛋白激酶 3

(MAPK3)、缺氧诱导因子-1 α (HIF1A)、胱天蛋白酶 3 (CASP3)、环加氧酶 2 (PTGS2)、鼠肉瘤病毒癌基因同源物 (HRAS)、基质金属蛋白酶 9 (MMP9) 进行结合能力预测。一般认为结合能小于 -17.78 kJ/mol (1 cal = 4.2 J) 提示配体与受体有一定的结合活性, 小于 -20.92 kJ/mol 有较好的结合活性, 小于 -29.29 kJ/mol 有强烈的结合活性^[14]。10 种活性成分与 10 个靶蛋白对接, 结合自由能结果见表 4, 用

PyMOL 软件对有强烈结合活性（结合能≤-29.29 kJ/mol）成分与靶点对接结果进行可视化，以野漆树

苷、芹菜素结合 PTGS2 及柚皮苷、柚皮素结合 HRAS 为例进行展示，见图 9。

表 4 化橘红活性成分与关键靶点结合能预测

Table 4 Prediction of binding energies of active ingredients and key targets in *Citri Grandis Exocarpium*

药物成分	结合能/(kJ·mol ⁻¹)									
	TP53	ACTB	TNF	VEGFA	MAPK3	HIF1A	CASP3	PTGS2	HRAS	MMP9
野漆树苷	-33.89	-43.10	-32.22	-37.66	-37.24	-25.10	-33.47	-42.68	-40.58	-37.66
川陈皮素	-26.36	-30.96	-26.78	-28.03	-30.54	-18.83	-26.78	-34.73	-31.80	-26.36
芹菜素	-27.61	-32.22	-26.36	-27.61	-34.73	-20.92	-29.71	-38.49	-35.98	-31.80
异橙黄酮	-25.94	-30.54	-27.61	-27.61	-28.87	-19.25	-26.78	-35.98	-31.38	-27.20
柚皮素	-25.94	-33.05	-26.36	-27.20	-29.29	-20.08	-27.20	-35.98	-33.89	-28.87
柚皮苷	-33.89	-35.15	-32.64	-37.24	-38.07	-24.69	-33.89	-40.17	-42.26	-36.82
枸橼苷	-33.05	-39.75	-31.80	-33.05	-35.98	-24.27	-34.73	-43.93	-40.17	-36.82
橘皮素	-27.61	-28.45	-25.52	-28.03	-32.22	-18.41	-27.20	-35.15	-31.38	-26.36
β-谷甾醇	-29.29	-35.15	-26.78	-28.03	-31.38	-23.01	-26.36	-38.49	-39.75	-31.80
甜橙黄酮	-26.36	-33.05	-25.10	-27.20	-28.87	-18.83	-27.20	-36.40	-32.64	-25.94

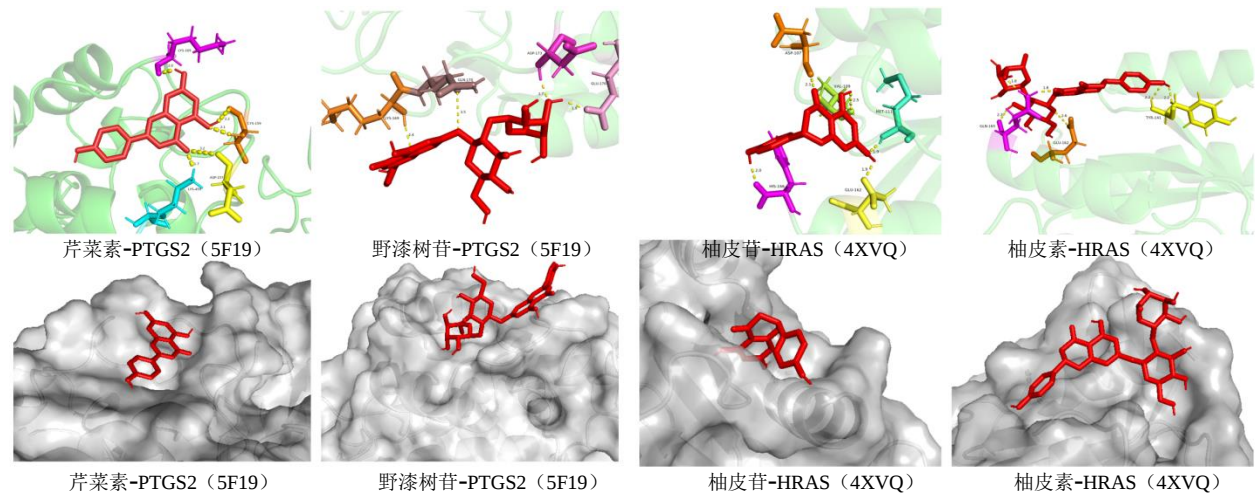


图 9 成分与靶点对接结果

Fig. 9 Component-to-target docking results

3 讨论

中药网络药理学以计算机网络为平台进行建模分析与靶点预测，将系统生物学与多向药理学结合起来，在系统层面对中药复方进行分析，对常用药或单味药作用机制，同时结合中医药多成分、多靶点、多通路的作用特点综合分析了中药在复杂网络中的调控机制，用以解释中药多成分-多靶点作用关系以反映中医药整体思维^[15-17]。

基于化橘红主要活性成分-靶点网络的分析，degree 值排列靠前的成分主要以黄酮类为主，表明这些成分可能是化橘红防治 PAH 的重要化合物。在

黄酮类成分中，经过拓扑学分析后 degree 值较大的成分主要有芹菜素、柚皮素、野漆树苷、柚皮苷、枸橼苷、川陈皮素和异橙黄酮等。研究表明，芹菜素具有抗炎、抗肿瘤、神经保护、降血糖、抗病毒、肥胖、免疫调节、防护辐射和止泻等作用^[18]。He 等^[19]实验显示，芹菜素在缺氧性肺动脉平滑肌细胞中可诱导线粒体依赖性细胞凋亡从而达到降低肺动脉压力的效果。Ren 等^[20]实验证明，芹菜素以依赖浓度和时间的方式显著抑制 miR-33 表达来促进三磷酸腺苷结合盒转运体 A1（ABCA1）的表达和胆固醇外流，降低血脂水平和减轻炎症反应，从而达

到预防动脉粥样硬化疾病的发生。Qin 等^[21]实验表明, 芹菜素和柚皮苷能显著增强血管反应, 可恢复乙酰胆碱介导的血管舒张作用, 血管内皮功能障碍将得以改善。目前已有证据表明, 柚皮素不仅具有抗氧化、抗炎、抗肿瘤、抗衰老、肝肾保护等多种药理作用^[22], 还具有抗心肌纤维化^[23]、肝纤维化^[24]、肾纤维化^[25]等作用; Ahmed 等^[26]研究发现, 柚皮素增加了 *L*-精氨酸在大鼠野百合碱诱导的肺动脉高压中的保护作用; 蒋怡芳等^[27]研究发现, 柚皮素对博来霉素诱导的肺纤维化有显著的抑制效果。Al-Shalabi 等^[28]实验表明, 野漆树苷在抑制慢性炎症导致的结缔组织增生、调节一氧化氮 (NO) 释放水平, 及结缔组织在炎症中促炎因子的相关基因表达的下调的作用与经典的非甾体抗炎药双氯芬酸的作用同样有效。柚皮苷具有抗氧化及抗炎作用近年已有报导, 有研究将其与抗坏血酸对比, 发现柚皮苷对 DPPH 自由基有着较好的清除作用^[29]; 另有相关研究表明, 柚皮苷和川陈皮素改善脂多糖 (LPS) 诱导的炎症损伤的相关机制可能与抑制核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白 3 (NLRP3) 炎性通路的活化及减轻其介导的凋亡和炎症有关^[30-31]。Wu 等^[32]研究发现柚皮苷通过抑制细胞外调节蛋白激酶 (ERK) 和核因子- κ B (NF- κ B) 信号通路以及肺动脉中的内皮到间充质转化过程从而对 PAH 具有治疗作用。李增等^[33]研究指出, 枸橼苷对内皮细胞外基质黏附及内皮细胞迁移表现出良好的抑制作用, 同时对鸡胚尿囊膜血管新生过程存在抑制作用, 以此推论枸橼苷可能对血管功能紊乱及血管重构存在抑制作用。

本研究以 PPI 网络交互分析选出 53 个核心靶点蛋白, 其中 degree 值较大的 TP53、ACTB、TNF、VEGFA、MAPK3、HIF1A、CASP3 和 PTGS2 等靶蛋白可能是化橘红防治 PAH 的关键作用靶点。TP53 是一种调节多种细胞过程的关键转录因子, 其表达与体外和体内细胞凋亡程度升高有关; TP53 可以通过抑制或激活关键基因或作用来诱导各种抗增殖程序^[34], 该基因的上调表达可能对 PAH 的血管内皮细胞过度增殖有抑制作用。研究表明, ACTB 作为肌动蛋白中的其中一种丰富且高度保守的细胞骨架结构蛋白, ACTB 通过调节血小板和血管内皮细胞中的内皮一氧化氮合酶 3 型 (eNOS3); 该基因靶点的上调有助于血管正向重塑来达到预防心血管疾病的目的; 而下调可能导致相关血管并发症发生, 如

动脉粥样硬化和血栓性疾病、缺血性卒中等^[35]。TNF 是健康生物体和疾病状态下哺乳动物免疫反应的关键介质和调节因子, Varfolomeev 等^[36]研究指出, TNF 诱导 MAP 激酶和 NF- κ B 依赖性细胞反应的强烈和快速激活, 从而有效地刺激凋亡和坏死性细胞死亡, 这一基因的上调或可抑制肺动脉平滑肌细胞的增殖达到降低肺动脉压力的效果。VEGFA 是一种高度特异性的促血管内皮细胞生长因子, 同时已被证实 VEGFA 是 PAH 发生的核心原因, 在患者的肺中也发现其表达量与正常组有显著差异。MAPK3 是丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 信号通路的重要成员, 参与细胞生长增殖、迁移、分化、稳态调节和凋亡, Tao 等^[37]研究发现通过激活 MAPK3 信号传导的 MICAL2 可抑制肺血管平滑肌的增殖。HIF1A 是缺氧诱导因子-1 (HIF-1) 的亚单位, 正常氧饱和度下的细胞中的 HIF1A 几乎不表达。CASP3 是半胱天冬酶家族的重要成员, 在细胞凋亡的执行阶段起着关键作用。有相关研究显示^[38], PAH 动物模型中 HIF1A 表达上升, CASP3 表达下调, 引起肺毛细血管平滑肌细胞过度增殖及血管重构。PTGS2 基因是一种诱导性即刻反应基因, 在正常生理状态下, 大多数组织细胞不表达, 但在病理反应发生过程中表达量显著提高, 与动脉型肺动脉高压疾病密切相关^[39]。

本研究对筛选得到的靶点进行了 GO 生物学功能和 KEGG 通路富集分析。GO 富集分析发现, 化橘红防治 PAH 的生物学功能主要在对药物的反应、对异物刺激的反应、对缺氧的反应、对凋亡过程的调节、基因表达的调控、对细胞增殖的调控等方面发挥调控作用, 与肺动脉血管内皮细胞增殖、重构密切相关。KEGG 通路富集分析得到与 PAH 较相关的 11 条重要生物通路, 其中较为显著的是癌症通路、脂质与动脉粥样硬化通路, 共有分别 45 和 26 个相关作用靶点富集在该通路上。癌症通路涵盖包括许多炎症因子介导的免疫反应及血管新生与重构相关的血管内皮增生和增殖反应, 机制较多, 该通路中存在多种与 PAH 发病机制相关的作用靶点, 如 PTGS2、HIF1A、HRAS、MAPK3、一氧化氮合酶 (NOS2)、MMP9、白细胞介素-2 (IL-2)、B 细胞 κ 轻链基因增强子核因子 1 (NF κ B1)、转化生长因子 β 受体 II (TGFR2)、VEGFA、白细胞介素-4 (IL-4)、细胞色素 C (CYCS)、过氧化物酶体增殖物激活受体 (PPARG)、TP53 等 (均为化橘红的有效成

分相关作用靶点)。在脂质与动脉粥样硬化信号通路中,炎症反应作为主导机制,脂质沉积作为该通路的重要环节参与了整个过程,PAH 患者的脂质沉积、炎症细胞浸润和氧化低密度脂蛋白(OX-LDL)增加,从而使患者的肺动脉中胆固醇转运减少,导致血浆和肺部的 OX-LDL 水平升高。这种脂毒性促进氧化应激和炎症,导致肺血管重塑。毫无疑问,氧化脂质介导动脉粥样硬化的发展,直接导致肺血管炎症和肺动脉平滑肌细胞(PASMC)增殖^[40]。根据预测结果,化橘红可能作用于 TNF、NOS3、MMP9、NFκB1 等炎症相关基因介导了脂质与动脉粥样硬化信号通路的激活,从而达到治疗 PAH 的作用。

本研究从化橘红中选取 degree 值排名前 10 的核心成分,以及拓扑学分析筛选出 53 个核心靶点中排名靠前的 10 个在疾病发生发展中可能起着关键作用的靶点蛋白,其中核心候选活性成分包括芹菜素、柚皮素、野漆树苷、枸橼苷、β-谷甾醇、川陈皮素、异橙黄酮、柚皮苷、橘皮素和甜橙黄酮,其可能主要作用于 TP53、ACTB、TNF、VEGFA、MAPK3、HIF1A、CASP3、PTGS2、HRAS、MMP9 等靶点。为了进一步探究各化合物与靶点作用情况,将此 10 个化合物分别与 10 个靶点蛋白进行分子对接初步验证,结果显示,除 HIF1A 外,9 个靶点蛋白与活性成分小分子化合物对接后的结合自由能<-20.92 kJ/mol,说明各化合物与靶点蛋白之间有良好的结合能力,而 HIF1A 与橘皮素和川陈皮素对接后的结合结果仅有-18.41、-18.83 kJ/mol,推测可能是由于 HIF1A 活性空腔较小,而橘皮素及川陈皮素相对分子质量较大,对接时位阻较大所致。从对接结果可以看出,野漆树苷、芹菜素、柚皮苷、枸橼苷等与该 10 个核心靶点对接的平均分子结合自由能均小于-29.29 kJ/mol。说明野漆树苷、芹菜素、柚皮苷、枸橼苷等可能对于 PAH 有着很好的治疗潜力,推测其主要作用于 TP53、ACTB、TNF、VEGFA、MAPK3、CASP3、PTGS2、HRAS 和 MMP9 等相关的通路和靶点发挥作用。此外,10 个核心化合物中,野漆树苷与 ACTB、PTGS2 的结合自由能小于-41.84 kJ/mol,枸橼苷与 PTGS2 的结合自由能小于-41.84 kJ/mol,柚皮苷与 HRAS 结合自由能小于-41.84 kJ/mol,推测野漆树苷、枸橼苷和柚皮苷能够通过分别作用于与 ACTB、PTGS2 和 HRAS 相关的通路和靶点发挥治疗 PAH 的作用。

综上所述,本研究运用多种公共数据库和软件,构建了化橘红防治 PAH“活性成分-共同作用靶点-信号通路”的复杂网络,并进行 GO 功能及 KEGG 通路富集分析,以及采用分子对接技术预测核心成分与靶点的结合情况,系统研究化橘红多靶点、多通路作用于 PAH 的分子机制,可为化橘红的新药开发及临床用药提供借鉴。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 邓晔,高树会,庞博,等.糖代谢异常及胰岛素抵抗与肺动脉高压的相关性研究进展[J].河北医药,2022,44(9):1408-1412.
- [2] 杨晓松.肺动脉高压的药物治疗进展[J].中国当代医药,2021,28(5):37-41.
- [3] 陈岩,胡燕琴.橘红与化橘红临床药用不同[J].北京中医,2001,20(2):43.
- [4] 胡梦君.化橘红黄酮对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞的抗炎作用及其机制探究[D].武汉:华中农业大学,2017.
- [5] 郭润民,吴子君,黄瑞娜,等.化橘红对大鼠糖尿病心肌病的防治作用及其机制研究[J].中国医药科学,2016,6(19):40-43.
- [6] 李沛波,湛攀,吴灏,等.基于文献分析和分子对接法探讨化橘红防治新型冠状病毒肺炎(COVID-19)的前景[J].中草药,2020,51(9):2368-2378.
- [7] 姚乐辉.化橘红多糖抗氧化能力及抗疲劳作用的研究[J].粮食与油脂,2019,32(4):95-100.
- [8] 程荷凤,李小凤,东野广智.化橘红水溶性多糖的化学及体外抗氧化活性的研究[J].化学世界,2002,43(2):91-93.
- [9] 侯秀娟.化橘红多糖的提取纯化、体外抗氧化及生物活性的研究[D].南昌:江西农业大学,2013.
- [10] Costa-Rodrigues J, Pinho O, Monteiro P R R. Can lycopene be considered an effective protection against cardiovascular disease? [J]. *Food Chem*, 2018, 245: 1148-1153.
- [11] 牛明,张斯琴,张博,等.《网络药理学评价方法指南》解读[J].中草药,2021,52(14):4119-4129.
- [12] Li P L, Liu M H, Hu J H, et al. Systematic chemical profiling of *Citrus grandis* *Tomentosa* by ultra-fast liquid chromatography/diode-array detector/quadrupole time-of-light tandem mass spectrometry [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2014, 90: 167-179.
- [13] 裴昆,夏放高,陈海芳,等.陈皮、化橘红和枳壳研究概况[J].江西中医药,2015,46(4):71-74.
- [14] Hsin K Y, Ghosh S, Kitano H. Combining machine learning systems and multiple docking simulation packages to improve docking prediction reliability for network pharmacology [J]. *PLoS One*, 2013, 8(12): e83922.
- [15] 陈健,陈启龙.网络药理学在中医药研究中的现状及

- 思考 [J]. 上海中医药大学学报, 2021, 35(5): 1-6.
- [16] 韩利文, 陈善军, 董榕, 等. 网络药理学在中药复杂作用模式研究中的应用进展 [J]. 山东科学, 2021, 34(6): 22-31.
- [17] 王哲义, 孙怿泽, 刘碧原, 等. 基于网络药理学和分子对接技术探讨丹参治疗缺血性脑卒中的作用机制 [J]. 药物评价研究, 2021, 44(2): 344-355.
- [18] 崔英杰. 芹菜素对自发性高血压大鼠心血管重塑的保护作用 [J]. 中国药物与临床, 2013, 13(5): 602-603.
- [19] He Y, Fang X, Zhou Y, et al. Apigenin attenuates pulmonary hypertension by inducing mitochondria-dependent apoptosis of PASMCs via inhibiting the hypoxia inducible factor 1 α -KV1.5 channel pathway [J]. *Chem Biol Interact*, 2020, 317: 108942.
- [20] Ren K, Jiang T, Zhou H F, et al. Apigenin retards atherogenesis by promoting ABCA1-mediated cholesterol efflux and suppressing inflammation [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 47(5): 2170-2184.
- [21] Qin W, Ren B, Wang S, et al. Apigenin and naringenin ameliorate PKC β II-associated endothelial dysfunction via regulating ROS/caspase-3 and NO pathway in endothelial cells exposed to high glucose [J]. *Vasc Pharmacol*, 2016, 85: 39-49.
- [22] 季鹏, 赵文明, 于桐. 柚皮素的最新研究进展 [J]. 中国新药杂志, 2015, 24(12): 1382-1386.
- [23] 谢发江, 邓莉, 李燕, 等. 柚皮素下调 RhoA/ROCK 信号通路改善糖尿病小鼠心肌纤维化机制探讨 [J]. 中药新药与临床药理, 2019, 30(6): 671-677.
- [24] Hernández-Aquino E, Quezada-Ramírez M A, Silva-Olivares A, et al. Naringenin attenuates the progression of liver fibrosis via inactivation of hepatic stellate cells and profibrogenic pathways [J]. *Eur J Pharmacol*, 2019, 865: 172730.
- [25] Meng X M, Zhang Y, Huang X R, et al. Treatment of renal fibrosis by rebalancing TGF- β /Smad signaling with the combination of Asiatic acid and naringenin [J]. *Oncotarget*, 2015, 6(35): 36984-36997.
- [26] Ahmed L A, Obaid A A Z, Zaki H F, et al. Naringenin adds to the protective effect of L-arginine in monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats: Favorable modulation of oxidative stress, inflammation and nitric oxide [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2014, 62: 161-170.
- [27] 蒋怡芳, 范晓杰, 刘晓, 等. 柚皮素对博来霉素诱导的小鼠肺纤维化的改善作用及其作用机制 [J]. 安徽医科大学学报, 2021, 56(2): 202-207.
- [28] Al-Shalabi E, Abusulieh S, Hammad A M, et al. Rhoifolin loaded in PLGA nanoparticles alleviates oxidative stress and inflammation *in vitro* and *in vivo* [J]. *Biomater Sci*, 2022, 10(19): 5504-5519.
- [29] 姜翠翠, 董舒梅, 邱松山, 等. 化橘红柚皮苷对 α -葡萄糖苷酶活性的抑制作用 [J]. 食品工业, 2020, 41(6): 189-193.
- [30] Luo Y L, Zhang C C, Li P B, et al. Naringin attenuates enhanced cough, airway hyperresponsiveness and airway inflammation in a Guinea pig model of chronic bronchitis induced by cigarette smoke [J]. *Int Immunopharmacol*, 2012, 13(3): 301-307.
- [31] 董传莹, 薛飞, 郝瑞, 等. 川陈皮素对脂多糖诱导的牙周膜细胞损伤和 NOD 样受体蛋白 3 炎性通路的影响 [J]. 中国临床药理学杂志, 2022, 38(17): 2013-2017.
- [32] Wu Y H, Cai C H, Xiang Y J, et al. Naringin ameliorates monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension through endothelial-to-mesenchymal transition inhibition [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 696135.
- [33] 李增, 陈灵芝, 刘晨. 枸橼苷抑制血管生成作用的研究 [J]. 时珍国医国药, 2016, 27(2): 277-279.
- [34] Feng Q, Tian T, Liu J F, et al. Deregulation of microRNA-31a-5p is involved in the development of primary hypertension by suppressing apoptosis of pulmonary artery smooth muscle cells via targeting TP53 [J]. *Int J Mol Med*, 2018, 42(1): 290-298.
- [35] Yang S, Zhao Y P, Chen X T, et al. The ACTB variants and alcohol drinking confer joint effect to ischemic stroke in Chinese Han population [J]. *J Atheroscler Thromb*, 2020, 27(3): 226-244.
- [36] Varfolomeev E, Vucic D. Intracellular regulation of TNF activity in health and disease [J]. *Cytokine*, 2018, 101: 26-32.
- [37] Tao W, Sun W M, Zhu H L, et al. MiR-205-5p suppresses pulmonary vascular smooth muscle cell proliferation by targeting MICAL2-mediated Erk1/2 signaling [J]. *Microvasc Res*, 2019, 124: 43-50.
- [38] Jin H F, Jiao Y, Guo L N, et al. Astragaloside IV blocks monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension by improving inflammation and pulmonary artery remodeling [J]. *Int J Mol Med*, 2021, 47(2): 595-606.
- [39] Xing Y J, Zhao S, Wei Q X, et al. A novel piperidine identified by stem cell-based screening attenuates pulmonary arterial hypertension by regulating BMP2 and PTGS2 levels [J]. *Eur Respir J*, 2018, 51(4): 1702229.
- [40] Calvier L, Herz J, Hansmann G. Interplay of low-density lipoprotein receptors, LRP6, and lipoproteins in pulmonary hypertension [J]. *JACC Basic Transl Sci*, 2022, 7(2): 164-180.

[责任编辑 金玉洁]