

• 药理与临床 •

基于模式生物斑马鱼研究姜黄抗血管新生的作用及机制

朱宗萍¹, 王继森^{2#}, 廖婉^{1*}, 陈姣¹, 陈意¹, 杨青松¹, 李锐^{1*}, 马云桐¹, 傅超美¹

1. 成都中医药大学药学院, 西南特色中药资源国家重点实验室, 四川 成都 611137

2. 成都市食品药品检验研究院, 四川 成都 610045

摘要: 目的 利用模式生物斑马鱼研究姜黄 *Curcuma longa* 抗血管新生作用, 并采用网络药理学和分子对接技术探究姜黄抗血管新生的作用机制。方法 采用模式生物斑马鱼模型, 考察姜黄挥发油、姜黄素以及姜黄水提液对斑马鱼节间血管生长的抑制作用, 检测各给药组斑马鱼节间血管生成数, 计算血管生成抑制率。利用网络药理学和分子对接技术预测姜黄抗血管新生的作用机制, 构建“药物-成分-靶点”网络和蛋白质-蛋白质相互作用 (protein-protein interaction, PPI) 网络, 进行基因本体 (gene ontology, GO) 富集分析及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; 通过 AutoDock vina 软件对活性成分与关键靶点进行分子对接验证。结果 姜黄挥发油、姜黄素以及姜黄水提液均可明显抑制斑马鱼血管新生 ($P < 0.05$), 呈剂量相关性, 其中姜黄素抑制血管生成作用最强。网络药理学预测发现姜黄共有 21 种主要活性成分, 可通过调节前列腺素 G/H 合酶 2 (prostaglandin G/H synthase 2, PTGS2)、维生素 D3 受体 (vitamin D3 receptor, VDR)、丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 (serine/threonine kinase 1, AKT1) 和血清白蛋白 (albumin, ALB) 等关键靶点, 进而调控磷脂酰肌醇-3-激酶 (phosphatidylinositol 3-kinases, PI3K)-AKT 和血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 等相关信号通路, 从而发挥抑制血管新生的作用。分子对接结果显示姜黄的主要活性成分与核心靶点均能自发结合。结论 姜黄挥发油、姜黄素以及姜黄水提液对斑马鱼血管新生的抑制作用存在差异, 姜黄抗血管新生具有多成分、多靶点、多途径的特点, 为姜黄对血管新生依赖性疾病的防治提供了参考。

关键词: 姜黄; 斑马鱼; 血管新生; 网络药理学; 分子对接

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2021)11-3257-12

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.11.013

Effect and mechanism of *Curcuma longa* anti-angiogenesis based on model biology zebrafishZHU Zong-ping¹, WANG Ji-sen², LIAO Wan¹, CHEN Jiao¹, CHEN Yi¹, YANG Qing-song¹, LI Rui¹, MA Yun-tong¹, FU Chao-mei¹

1. State Key Laboratory of Southwestern Chinese Medicine Resources, School of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China

2. Chengdu Institute of Food and Drug Inspection, Chengdu 610045, China

Abstract: Objective To study the anti-angiogenesis effect of Jianghuang (*Curcuma longa*) by model biology zebrafish, and predict the mechanism based on network pharmacology and molecular docking technology. **Methods** The inhibitory effect of volatile oil of *C. longa*, curcumin and decoction of *C. longa* on intersegmental vascular growth of zebrafish were studied by model biology zebrafish. The number of intact vessels was counted and inhibitory rate of angiogenesis was calculated. Network pharmacology and

收稿日期: 2020-12-02

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (82073994); 四川省科技厅国际合作项目 (2018HH0122); 四川省杰出青年科技人才基金资助项目 (2020JDJQ0049); 四川省科技计划重点研发项目 (2020YFN0152); 成都市科技局国际科技合作项目 (2017-GH02-00054-HZ); 成都中医药大学科技转化项目 (CGPY1605); 成都大学农业部杂粮加工重点实验室开放课题 (2019CC02); 教育部春晖计划项目 (20191083-127)

作者简介: 朱宗萍 (1997—), 女, 硕士研究生, 从事中药新制剂、新剂型及炮制研究。E-mail: 2320417956@qq.com

***通信作者:** 廖婉, 女, 博士, 教授, 硕士生导师, 从事新制剂、新剂型及中药炮制工艺与机制研究。E-mail: liaowan@cducm.edu.cn

李锐, 男, 博士, 教授, 硕士生导师, 从事中药的化学分析、质量控制及体内代谢研究。E-mail: lirui@cducm.edu.cn

#共同第一作者: 王继森 (1982—), 男, 主管药师, 硕士, 从事药品检验研究工作。E-mail: 93230623@qq.com

molecular docking technology were used to predict the anti-angiogenesis mechanism of *C. longa*. “Drug-component-target” and protein-protein interaction (PPI) network were constructed. Gene ontology (GO) enrichment analysis and Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) pathway enrichment analysis were performed. AutoDock vina was used to verify the molecular docking between active ingredients and key target. **Results** The volatile oil of *C. longa*, curcumin and decoction of *C. longa* significantly inhibited zebrafish angiogenesis with dose-dependent ($P < 0.05$), and curcumin had the strongest inhibitory effect on angiogenesis. Network pharmacology predicted that there were 21 main active ingredients in *C. longa*, which regulated phosphatidylinositol 3-kinases-serine/threonine kinase (PI3K-AKT), vascular endothelial growth factor (VEGF) and other related signal pathways by regulating key targets such as prostaglandin G/H synthase 2 (PTGS2), vitamin D3 receptor (VDR), AKT1, and albumin (ALB), thereby inhibited angiogenesis. Molecular docking showed that main active ingredients and key targets could be spontaneously combined. **Conclusion** The volatile oil of *C. longa*, curcumin and decoction of *C. longa* had different inhibitory effects on angiogenesis of zebrafish, anti-angiogenesis effect of *C. longa* has characteristics of multiple components, multiple targets and multiple pathways, which provides a reference for prevention and treatment of angiogenesis dependent diseases.

Key words: *Curcuma longa* L.; zebrafish; angiogenesis; network pharmacology; molecular docking technology

血管新生是指在原有血管的基础上构建新血管的过程。在正常生理状况下,体内抗血管与促血管因子之间呈动态平衡;当机体受到过度促血管因子刺激时,会导致异常的过度的病理性血管新生。病理性血管新生是人类恶性肿瘤、心血管疾病和其他疾病发生发展的重要进程^[1],癌症、糖尿病视网膜病变、动脉粥样硬化、类风湿性关节炎等70余种疾病均与血管过度生成有关,因此抗血管新生的研究对于治疗血管新生依赖性疾病具有重要意义^[2]。传统中医药理论虽无“血管新生”这一概念,但《素问·脉要精微论》提出“脉”为气血运行之通道,其中络脉主血、入血伤络,可见血管新生相关疾病与中医络脉的病变密切相关,中医临床上多选用活血化瘀类中药治疗络脉病变^[3]。因此,中药治疗病理性血管新生具有一定的理论依据和优势。

姜黄为姜科植物姜黄 *Curcuma longa* L.的干燥根茎。姜黄属植物的药用记载始于《唐本草》^[4],姜黄性辛,味苦、温,入脾、肝经,可破血行气、通经止痛,用于治疗胸胁刺痛、胸搏心痛、痛经经闭、癥瘕、风湿肩臂疼痛、跌扑肿痛等症^[5]。现代药理学研究表明,姜黄具有抗炎、调血脂、抗氧化、抗动脉粥样硬化、抗肿瘤等作用^[6-7]。姜黄素和挥发油类成分为姜黄中的主要活性成分,姜黄素能够通过上调微小核糖核酸-126 (microRNA-126, miR-126),负调控血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF),抑制磷脂酰肌醇-3-激酶 (phosphatidylinositol 3-kinases, PI3K)-丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 (serine/threonine kinase, AKT) 和酪氨酸激酶 2/信号传导及转录激活因子 5A (Janus kinase 2/signal transducer and activator of transcription 5,

JAK2/STAT5) 信号通路,从而发挥抗动脉粥样硬化作用^[8],还能够通过影响 miR-1275 及 miR-1246 的靶基因 VEGFB 和核转录因子- κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) 表达,减少角膜内血管生成^[9]。姜黄挥发油成分 β -榄香烯能够下调原发性黑色素瘤中血管生成标志物 CD34 表达,抑制肿瘤生长^[10]。

斑马鱼是辐鳍亚纲鲤科的一种热带硬骨鱼,原产于南亚地区^[11]。由于其基因组序列与人类具有87%的高度相似性,胚胎透明且实验周期短,被广泛应用于药物研究^[12]。flk1-EGFP 转基因斑马鱼常用于心脏、节间血管、脑血管系统等研究,荧光显微镜下血管的内皮细胞呈绿色荧光,可以直接观察斑马鱼血管的生成情况,是一种便捷的抗血管新生的体内研究模型^[13]。本研究以转基因荧光斑马鱼为模式生物,探究姜黄抑制斑马鱼胚胎血管新生的作用,并通过网络药理学构建“药物-成分-靶点”网络,结合分子对接技术,以整体性、系统性的角度阐释姜黄抗血管新生的作用机制,为姜黄防治血管新生依赖性疾病的药效物质基础提供科学依据。

1 材料

1.1 动物

转基因型 flk1-EGFP 品系斑马鱼,购自国家斑马鱼资源中心,由成都中医药大学药学院斑马鱼实验平台培养和繁殖。

1.2 药材

姜黄饮片(批号 20200225)购自成都荷花池中药材专业市场春宇药堂,经成都中医药大学马云柯教授鉴定为姜科植物姜黄 *C. longa* L.的干燥根茎。

1.3 药品与试剂

姜黄素(批号 wkq19012802)、去甲氧基姜黄素

(批号 140815)、双去甲氧基姜黄素(批号 wkq16090905)、芳姜黄酮(批号 wkq20082006)、莪术醇(批号 wkq16060204)购自四川省维克奇生物科技有限公司,质量分数均 $\geq 98\%$;二甲基亚砜(DMSO,批号 C10843959)购自上海麦克林生化科技有限公司;链霉菌蛋白酶(批号 306X014)购自北京索莱宝科技有限公司;VEGF受体酪氨酸激酶亚群抑制剂PTK787(批号 18805,质量分数为99.97%)购自美国 MedChemExpres 公司;MS-222、甲基纤维素购自美国 Sigma 公司。

1.4 仪器

斑马鱼培育与繁殖系统(北京爱生科技发展有限公司);恒温培养箱(上海一恒科技有限公司);SMZ-645型体视显微镜、SMZ-1500型荧光显微镜(日本 Nikon 公司)。

2 方法

2.1 姜黄抗斑马鱼血管新生作用

2.1.1 供试品溶液的制备

(1)姜黄挥发油溶液的制备 取姜黄药材粉末(过2号筛)100 g,采用水蒸气蒸馏法提取姜黄挥发油成分,以含0.1% DMSO的胚胎培养水作为溶剂,分别配制质量浓度为100、50、25、10、1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的姜黄挥发油溶液。

(2)姜黄素溶液的制备 取姜黄素1 mg,以含0.1% DMSO的胚胎培养水作为溶剂,分别配制质量浓度为100、50、25、10、1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的姜黄素溶液。

(3)姜黄水提液的制备 取姜黄药材粉末(过5号筛)1 mg,加10倍量水,回流提取1 h,滤过,以含0.1% DMSO的胚胎培养水作为溶剂,分别配制质量浓度为100、50、25、10、1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的姜黄水提液。

(3)PTK787溶液的制备 精密称定PTK787,以含0.1% DMSO的胚胎培养水作为溶剂,分别配制质量浓度为0.200、0.100、0.050、0.025 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的PTK787溶液。

2.1.2 姜黄挥发油溶液和姜黄水提液的质量控制

(1)气相色谱-质谱联用(GC-MS)法测定姜黄挥发油成分 取姜黄药材的挥发油100 μL ,用正己烷稀释50倍,定容至5 mL量瓶,经0.45 μm 微孔滤膜滤过,注入气相色谱仪进行测定^[4]。

(2)混合对照品溶液的制备 精密称定姜黄素、去甲氧基姜黄素、双去甲氧基姜黄素、莪术醇、芳姜黄酮于5 mL量瓶中,加甲醇振荡后定容,得

到质量浓度为0.224、0.241、0.238、0.257、0.232 g/L 的混合对照品溶液。

(3)超高效液相色谱(UPLC)双波长法(214 nm、430 nm)测定姜黄水提液成分 取姜黄药材粉末(过5号筛)1 g,加10倍量水,回流提取1 h,经0.45 μm 微孔滤膜滤过,注入超高效液相色谱仪进行测定^[15]。

2.1.3 分组与给药 取受精后24 h的斑马鱼胚胎,采用链霉菌蛋白酶(0.1 mg/mL)脱膜,随机分为对照组、姜黄挥发油组、姜黄素组、姜黄水提液组和PTK787组,置于含药液的24孔板中,每孔10~15粒胚胎,每孔终体积为1.5 mL,培养板于28 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中培养24 h。

2.1.4 指标观察 采用0.016% MS-222麻醉斑马鱼胚胎,调整斑马鱼姿势,使两侧眼、体节重合,采用体式荧光显微镜进行血管表型观察,然后于3%甲基纤维素中固定并拍照。观察完整体节间血管(intersegmental vessel, ISV)和缺陷ISV的形态,以评估姜黄的抗血管生成活性,根据体节间血管生成数目计算抑制率。

血管生成抑制率=(对照组血管生成数-给药组血管生成数)/对照组血管生成数

2.1.5 数据处理 采用SPSS 23.0软件进行单因素方差分析,结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

2.2 基于网络药理学和分子对接探究姜黄抗血管新生的作用机制

2.2.1 姜黄主要成分和靶点的筛选 基于中药系统药理学技术平台(TCMSP),以口服生物利用度 $> 30\%$ 且类药性 > 0.10 为筛选条件,对姜黄的成分进行筛选,同时结合相关文献,确定姜黄的主要成分。采用TCMSP数据库及PharmMapper服务器(<http://lilab-ecust.cn/pharmmapper/submitfile.html>)检索获取活性成分对应的靶点并取合集,应用Uniprot(<https://sparql.uniprot.org/>)数据库,检索得到靶点名称对应的基因命名,用作后续研究。

2.2.2 抗血管新生靶点的预测与筛选 以“antiangiogenesis”“anti-angiogenesis”和“inhibits angiogenesis”为关键词,在Gene Cards数据库(<http://www.genecards.org/>)和OMIM数据库(<http://www.omim.org>)中检索得到与抗血管新生相关的靶点,运用Venny平台(<https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/>)将姜黄主要成分对应的靶点与抗血管新生相关的靶点进行映射,得到姜黄抗血管

新生的交集靶点。

2.2.3 “药物-成分-靶点”网络的构建 将姜黄的主要成分和抗血管新生作用靶点导入 Cytoscape 3.7.1 软件, 构建“药物-成分-靶点”网络。通过 network analyzer 和 cytoNCA 插件对网络结构进行分析, 并计算网络参数, 包括度值、介数以及紧密度, 筛选出姜黄抗血管新生的主要活性成分及其主要靶点等信息。

2.2.4 蛋白质-蛋白质相互作用 (protein-protein interaction, PPI) 网络的构建 将姜黄抗血管新生的靶点导入 String 数据库 (<https://string-db.org/>), 种属选择“Homo sapiens”, 交互作用选择 >0.4 的靶点, 并隐藏游离的节点。采用 R 语言计算 PPI 网络中每个靶点的连接节点数量, 输出可视化柱状图, 用以确定 PPI 网络中的核心基因, 并导入 Cytoscape 3.7.1 软件, 构建姜黄抗血管新生的 PPI 网络, 按度值大小进行分类和排序。

2.2.5 基因本体 (gene ontology, GO) 功能富集分析及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 将姜黄抗血管新生的靶点输入 DAVID 数据库 (<https://david.ncifcrf.gov/summary.jsp>), 对姜黄抗血管新生的靶点进行 GO 富集分析以及 KEGG 通路富集分析, 设定阈值 $P < 0.05$, 筛选排名靠前的生物过程和通路, 采用 R 语言以及 Cytoscape 3.7.1

软件绘制可视化图形。

2.2.6 分子对接模拟 选择度值排名前 8 的活性成分作为配体, “药物-成分-靶点”网络中度值排名前 5 的核心靶点和 PPI 网络中度值排名前 5 的核心基因作为受体, 采用 AutoDock vina 软件进行分子对接, 得到结合能和结合位点, 并作热图分析。

3 结果

3.1 姜黄挥发油溶液和姜黄水提液的质量控制

姜黄挥发油 GC-MS 总离子流色谱图见图 1-A, 定性分析结果见表 1, 芳姜黄酮是姜黄挥发油的主要成分, 质量分数高达 29.52%。采用 UPLC 双波长法对姜黄水提液进行定性, 如图 1-B、C 所示, 430 nm 处检测出姜黄素、去甲氧基姜黄素和双去甲氧基姜黄素, 214 nm 处检测出芳姜黄酮和莪术醇。

3.2 姜黄抗斑马鱼血管新生作用

如图 2 和表 2 所示, 与对照组相比, 各给药组斑马鱼节间血管生成缺失且杂乱, 呈断裂趋势; 各给药组均具有抑制斑马鱼血管新生的作用, 且呈剂量相关性。当剂量为 100、50、25、1 $\mu\text{g/mL}$ 时, 血管生成抑制率排序为姜黄素 > 姜黄挥发油 > 姜黄水提液; 当剂量为 10 $\mu\text{g/mL}$ 时, 血管生成抑制率排序为姜黄挥发油 > 姜黄素 > 姜黄水提液; 当剂量为 1 $\mu\text{g/mL}$ 时, 各给药组斑马鱼血管新生抑制率均较低, 个别呈现无抑制作用。此外, 各剂量给药组均无致胚胎死亡和致胚胎畸形的趋势。

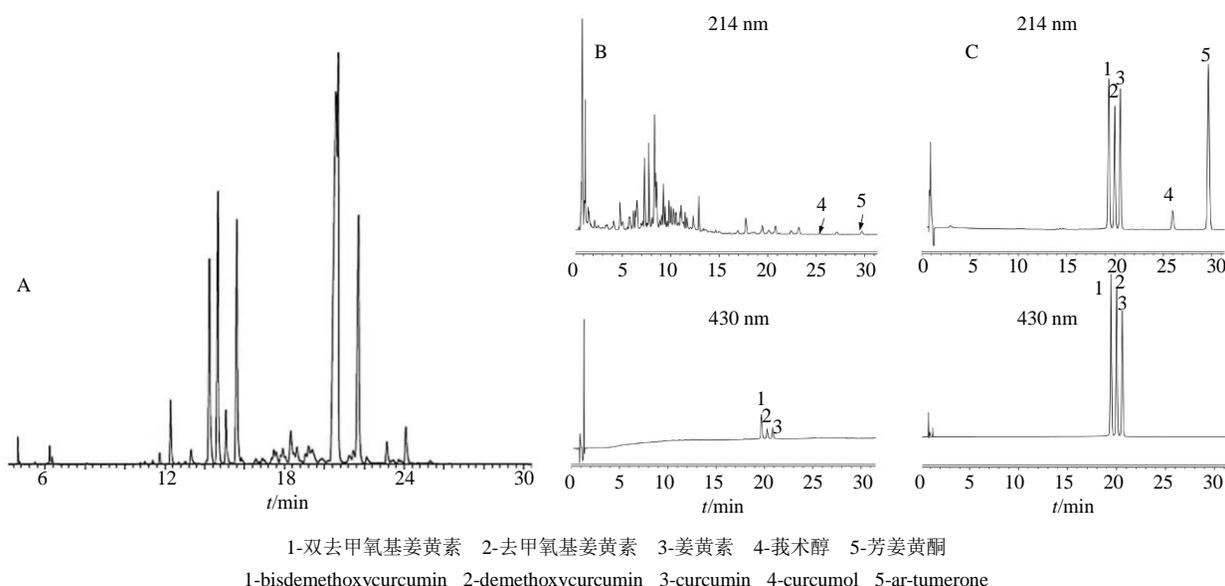


图 1 姜黄挥发油 GC-MS 总离子流色谱图 (A)、姜黄水提液 (B) 及混合对照品溶液 (C) 色谱图

Fig. 1 GC-MS total ion flow chromatogram of volatile oil of *C. longa* (A), chromatography of decoction of *C. longa* (B), and mixed reference substances solution (C)

表 1 姜黄挥发油成分鉴定

Table 1 Identification of ingredient in volatile oil of *C. longa*

序号	<i>t_R</i> /min	化合物	CAS 号	相对分子质量	分子式	占比/%
1	4.635	萘品油烯	586-62-9	136	C ₁₀ H ₁₆	0.43
2	6.229	伞花烃	99-87-6	134	C ₁₀ H ₁₄	0.41
3	6.351	α-松油醇	98-55-5	154	C ₁₀ H ₁₈ O	0.18
4	11.398	β-榄香烯	515-13-9	204	C ₁₅ H ₂₄	0.12
5	11.745	α-bergamotenol	88034-74-6	220	C ₁₅ H ₂₄ O	0.35
6	12.294	β-石竹烯	87-44-5	204	C ₁₅ H ₂₄	1.96
7	13.322	β-金合欢烯	18794-84-8	204	C ₁₅ H ₂₄	0.52
8	14.240	芳姜黄烯	644-30-4	202	C ₁₅ H ₂₂	7.81
9	14.661	姜烯	158848-19-2	204	C ₁₅ H ₂₄	9.83
10	15.066	β-甜没药烯	495-61-4	204	C ₁₅ H ₂₄	2.02
11	15.614	β-倍半水芹烯	73744-93-1	204	C ₁₅ H ₂₄	8.95
12	16.896	反式-橙花叔醇	40716-66-3	222	C ₁₅ H ₂₆ O	0.11
13	17.468	methyl 3-methyl-3-phenylbutanoate	25080-84-6	192	C ₁₂ H ₁₆ O ₂	0.61
14	17.601	氧化石竹烯	1139-30-6	220	C ₁₅ H ₂₄ O	0.52
15	18.323	7-methoxymethyl-2,7-dimethylcyclohepta-1,3,5-triene	73992-48-0	164	C ₁₁ H ₁₆ O	1.84
16	19.056	(±)- <i>trans</i> -nuciferol	39599-18-3	218	C ₁₅ H ₂₂ O	0.45
17	19.876	β-姜黄烯	6753-98-6	202	C ₁₅ H ₂₂	0.44
18	20.581	芳姜黄酮	532-65-0	216	C ₁₅ H ₂₀ O	29.52
19	21.453	柏木烯醇	28231-03-0	220	C ₁₅ H ₂₄ O	0.60
20	21.719	姜黄新酮	87440-60-6	218	C ₁₅ H ₂₂ O	11.58

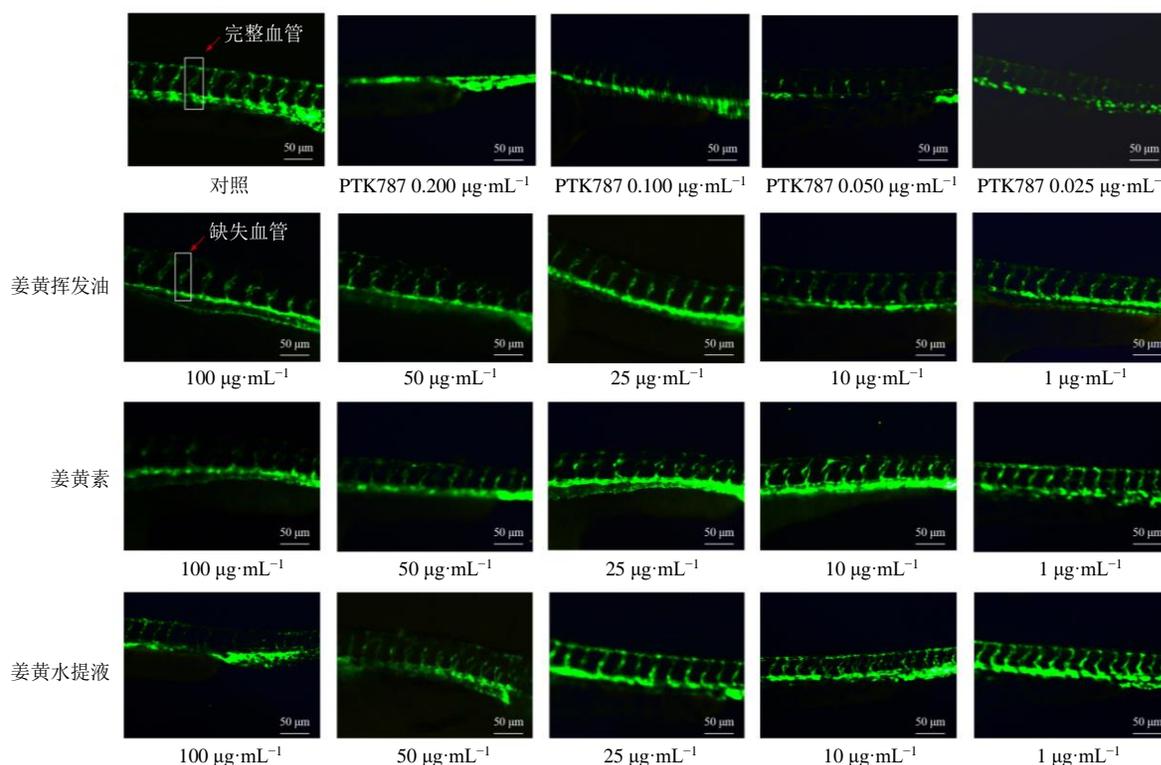


图 2 姜黄挥发油、姜黄素和姜黄水提液对斑马鱼血管新生的影响 (×100)

Fig. 2 Effect of volatile oil of *C. longa*, curcumin and decoction of *C. longa* on zebrafish angiogenesis (×100)

3.3 基于网络药理学和分子对接探究姜黄抗血管新生的作用机制

3.3.1 姜黄主要成分的筛选 TCMSP 数据库检索出姜黄化学成分 52 个, 通过口服生物利用度 > 30%

且类药性 > 0.10, 共筛选得到活性成分 14 个。通过查阅文献, 发现姜黄素、β-榄香烯等成分虽然口服生物利用度差, 但具有较好的生物活性和类药性, 因此, 整合数据后共得到活性成分 21 个, 见表 3。

表2 姜黄挥发油、姜黄素和姜黄水提液对斑马鱼血管新生的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)Table 2 Effect of volatile oil of *C. longa*, curcumin and decoction of *C. longa* on zebrafish angiogenesis ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	质量浓度/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	血管生成数/条	血管生成抑制率/%
对照	—	22±2	—
PTK787	0.025	12±3*	46.21±12.33
	0.050	5±1*	77.27±4.06
	0.100	2±1*	90.91±4.97
	0.200	0±1*	99.24±1.85
姜黄挥发油	1	18±1*	18.18±5.74
	10	16±1*	26.52±5.31
	25	12±3*	43.94±11.73
	50	10±2*	53.03±10.62
姜黄素	100	6±1*	73.48±6.04
	1	19±2*	15.91±8.50
	10	13±4*	40.15±20.41
	25	8±2*	65.15±8.93
姜黄水提液	50	5±2*	77.27±9.53
	100	3±1*	86.36±4.98
	1	20±2	10.61±9.81
	10	19±3*	15.91±12.44
	25	16±2*	28.79±7.42
	50	13±3*	41.67±11.99
	100	10±2*	54.55±7.04

与对照组比较: * $P < 0.05$ * $P < 0.05$ vs control group

表3 姜黄主要活性成分

Table 3 Main active ingredients of *C. longa*

编号	Mol ID	名称	PubChem CID	口服生物利用度/%	类药性
1	MOL000449	stigmasterol	5280794	43.83	0.76
2	MOL000493	campesterol	173183	37.58	0.71
3	MOL000612	(-)- α -cedrene	6431015	55.56	0.10
4	MOL000898	curcumenone	153845	34.17	0.11
5	MOL000900	curzerenone	3081930	57.05	0.11
6	MOL000901	BRN 3094585	167812	87.82	0.13
7	MOL000902	curcumol	14240392	103.55	0.13
8	MOL000948	4-methoxy-5-hydroxybis	—	53.67	0.11
9	MOL000949	isoprocurcumenol	14543198	46.11	0.10
10	MOL000953	CLR	5997	37.87	0.68
11	MOL000959	zedoaronol	24834047	59.37	0.12
12	MOL000960	procurcumadiol	14633012	69.82	0.13
13	MOL000961	procurcumenol	189061	34.4	0.10
14	MOL000969	dicumene	74681	38.08	0.11
15	MOL000945	bisdemethoxycurcumin	45934475	3.35	0.26
16	MOL001603	demethoxycurcumin	5469424	4.37	0.33
17	MOL002581	curcumin	24884282	4.37	0.41
18	MOL000908	β -elemene	6918391	25.63	0.06
19	MOL000027	α -curcumene	442360	4.68	0.06
20	MOL000910	germacrone	6436348	32.50	0.07
21	MOL000950	ar-tumerone	558221	29.47	0.07

3.3.2 潜在靶点的预测 采用 TCMSp 数据库及 PharmMapper 数据库得到姜黄 21 个活性成分对应的靶点, 删除重复靶点, 得到靶点 950 个。以相关性分数 ≥ 5 为筛选条件, 删除重复靶点, 得到与抗

血管新生相关靶点 1416 个。利用 Venny 平台对其进行交集, 得到 106 个抗血管新生相关的潜在靶点。

3.3.3 “药物-成分-靶点”网络的构建 “药物-成分-靶点”网络如图 3 所示, 黄色代表姜黄, 绿色代

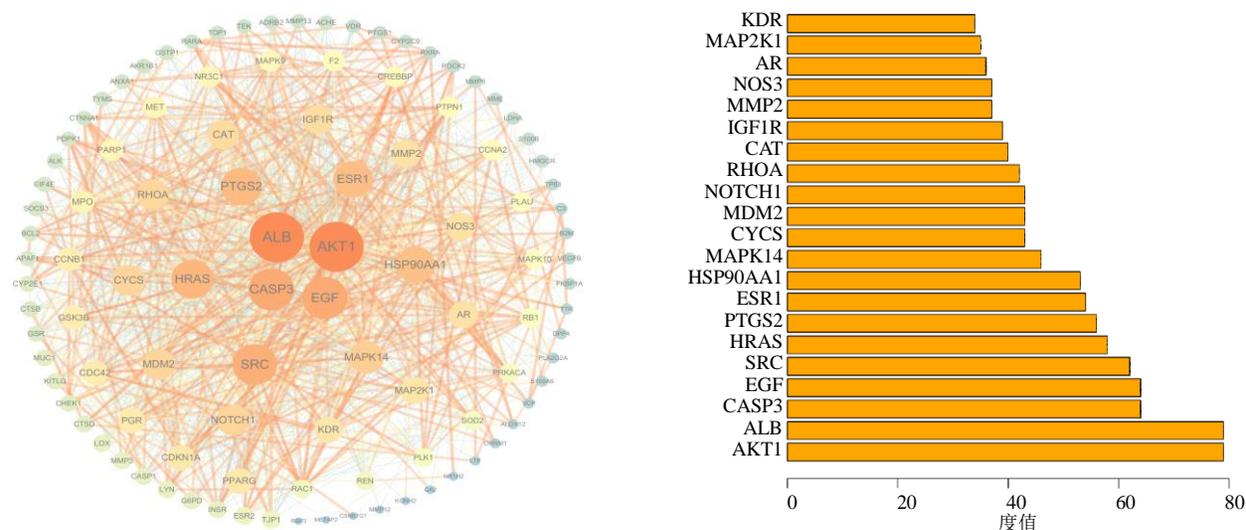


图4 姜黄抗血管新生 PPI 网络图及核心基因柱状图

Fig. 4 PPI network of *C. longa* anti-angiogenesis and core gene column

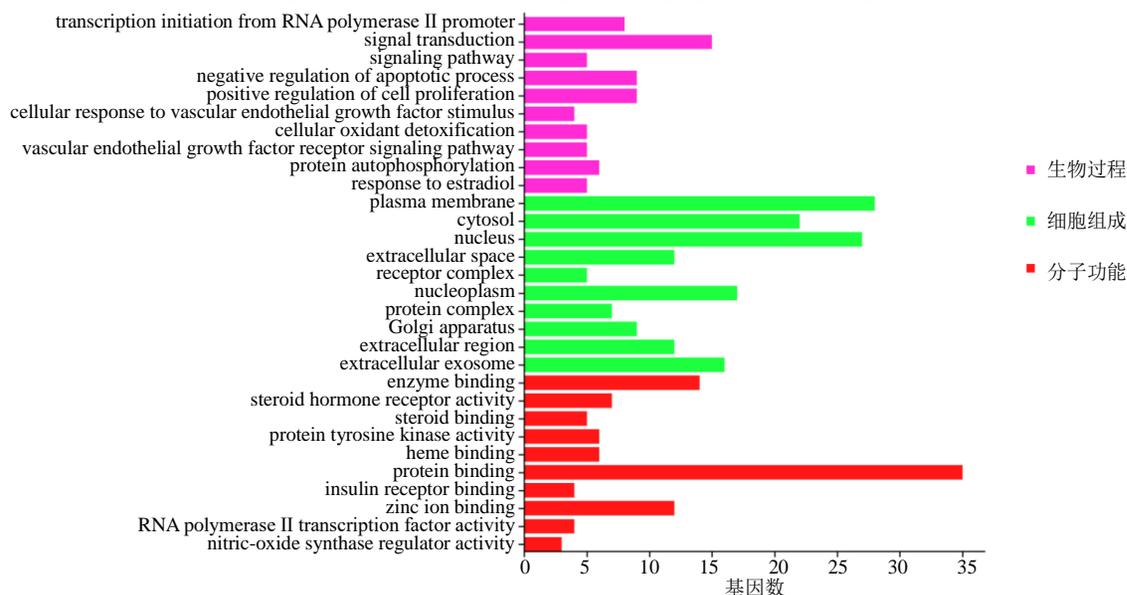


图5 姜黄抗血管新生 GO 分析

Fig. 5 GO analysis of *C. longa* anti-angiogenesis

共富集到 116 条通路，根据 $P < 0.05$ ，取 P 值最小的前 20 条通路，采用 R 语言绘制气泡图，Cytoscape 3.7.1 绘制“靶点-通路”图，如图 6 所示，姜黄抗血管新生主要涉及 VEGF 信号通路、PI3K-Akt 信号通路、FoxO 信号通路、雌激素信号通路、催乳素信号通路、甲状腺激素信号通路等，同时姜黄活性成分还参与了前列腺癌、EGFR 酪氨酸激酶抑制剂耐药、动脉粥样硬化、乳腺癌、膀胱癌、激活血小板、结直肠癌等信号通路，可见姜黄能够通过抗血管新生机制来改善动脉粥样硬化、肿瘤等疾病。

3.3.6 分子对接验证 对度值排名前 8 的活性成分与网络图中的核心靶点以及 PPI 网络中的核心基因

进行分子对接，最低结合能热图见图 7，横坐标为核心靶点，纵坐标为姜黄的活性成分及抗血管新生临床常用药物索拉菲尼，颜色的深浅代表最低结合能大小，活性成分与靶点的最低结合能均小于 0，表明配体与受体可以自发结合。吉马酮 10 个核心靶点的结合能均小于 -5.0 kJ/mol，豆甾醇与 6 个核心靶点的结合能均小于 -5.0 kJ/mol， β -榄香烯、姜黄酮与核心靶点的结合能力也较好，莪术醇与 7 个核心靶点的结合能均小于 -5.0 kJ/mol。各主要活性成分与关键靶点的分子对接模拟图见图 8，莪术醇与 VDR 的结合能力最好，对其做构象聚类分析见图 9，莪术醇与 VDR 在 LYS-321 结合位点处形成

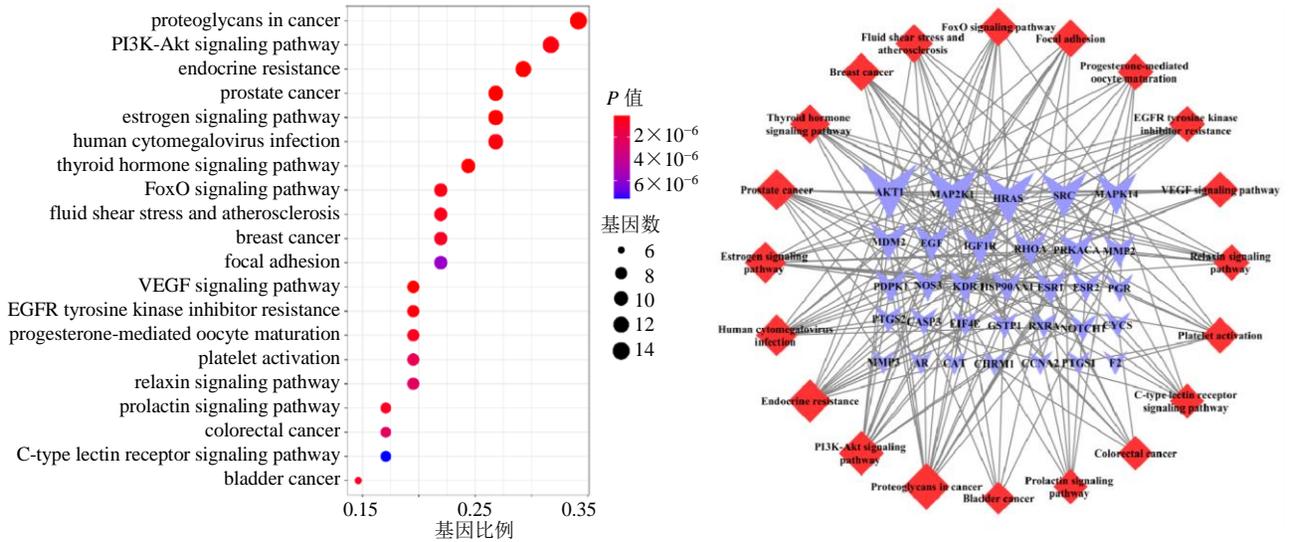


图6 姜黄抗血管新生 KEGG 分析和“靶点-通路”图

Fig. 6 KEGG analysis of *C. longa* anti-angiogenesis and “target-pathway” network

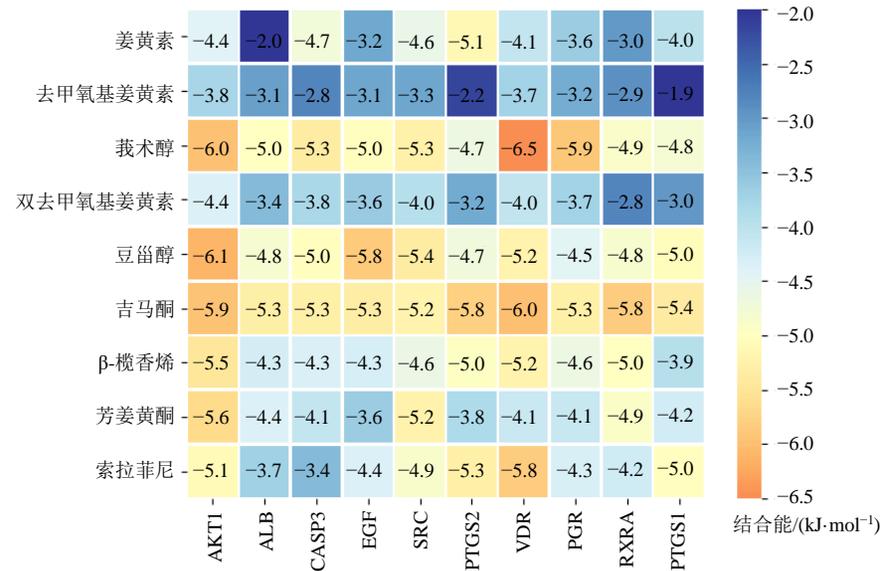


图7 姜黄主要活性成分与关键靶点结合能热图

Fig. 7 Heat map of binding energy between major active components of *C. longa* and key targets

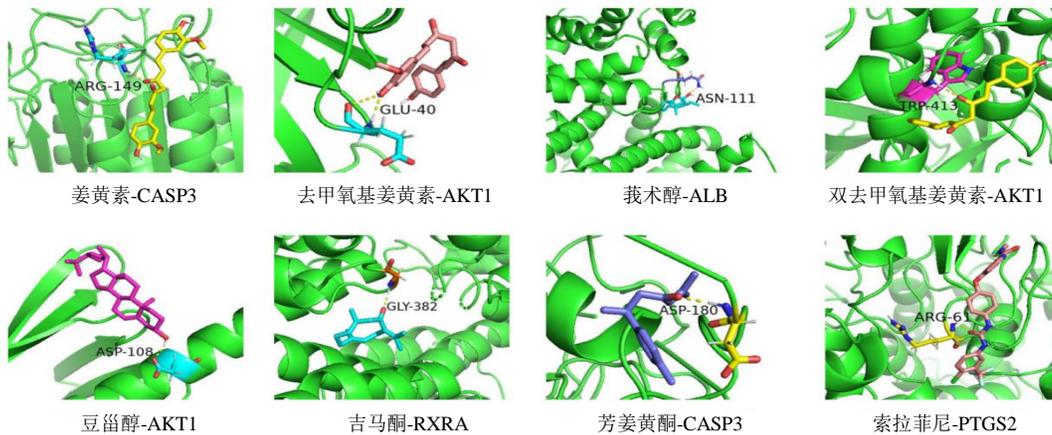


图8 姜黄主要活性成分与关键靶点分子对接模拟图

Fig. 8 Simulation diagram of docking between main active components of *C. longa* and key targets

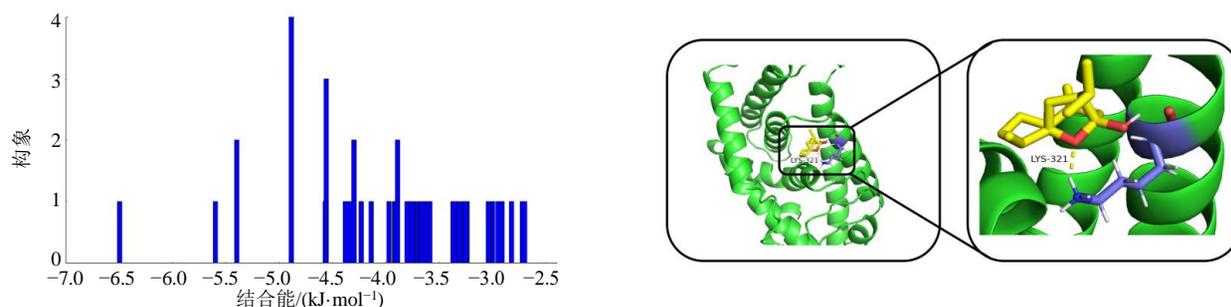


图9 莪术醇-VDR 集成构象交互直方图与分子对接图

Fig. 9 Curcumol-VDR integrated conformation interaction histogram and molecular docking diagram

最优构象。簇分析发现,在-4.8 kJ/mol 处聚类最多,且所有构象结合能均小于 0,表明莪术醇与 VDR 结合较好。姜黄素、去甲氧基姜黄素和双去甲氧基姜黄素虽是姜黄抗血管新生度值较高的活性成分,但与核心靶点的结合能普遍较低,可能与其水溶性差、生物利用度较低有关。

4 讨论

斑马鱼是研究血管生成的新型模式生物,其血管发育开始于原肠胚形成时期,与包括人类在内的高级脊椎动物非常相似,并贯穿于整个生命过程^[16]。flk1-EGFP 转基因斑马鱼是一种在血管内皮细胞表面表达 GFP 荧光信号的转基因动物,在蓝色荧光下其血管呈绿色。普通哺乳动物如鼠、家兔等的血管深藏体内不易观察,解剖行为会对血管造成一定的破坏;经典血管模型鸡胚绒毛尿囊膜模型虽具有一定的透明度,但其尿囊膜本身存在的血管会影响药物作用后新生血管计数,且鸡和人的种属差异也会使体外实验结果和临床试验结果存在较大差异^[17]。斑马鱼因与人类基因的高度相似性及其胚胎独特的光学清晰度,成为了体内血管动态生成研究的高通量、高效率的优势模式生物。本研究基于模式生物斑马鱼比较姜黄挥发油、姜黄素和姜黄水提液对血管的抑制作用,预实验发现药物质量浓度为 1000、500、100、1 μg/mL 时,各给药组均对斑马鱼血管生成有抑制作用;药物质量浓度为 1000、500 μg/mL 时具有明显的致畸作用,还有较强的胚胎致死作用,因此,本研究选取 1~100 μg/mL 的质量浓度研究姜黄挥发油、姜黄素和姜黄水提液对斑马鱼血管新生的抑制作用。

本研究构建“药物-成分-靶点”网络,分析姜黄活性成分与靶点的相互作用关系,预测得到 8 个姜黄抗血管新生关键活性成分,其中姜黄素、去甲

氧基姜黄素、双去甲氧基姜黄素属于姜黄素类,芳姜黄酮、吉马酮、β-榄香烯、莪术醇为倍半萜类,豆甾醇为植物甾醇类^[4]。研究发现,姜黄活性成分具有明显的血管新生调控作用。3 种姜黄色素类成分均能下调 VEGF、黏附分子-1 (intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1)^[18]和基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinases, MMPs) 表达^[19],抑制血管瘤内皮细胞 HemECs、人脐静脉内皮细胞 HUVEC 的增殖^[20]。姜黄挥发油组分能够明显抑制人肺微血管内皮细胞增殖,且明显对鸡胚绒毛尿囊膜血管生成抑制作用^[21]。芳姜黄酮为姜黄挥发油中的特征性成分,其含量最高可达姜黄挥发油类成分的 50%^[22],能够抑制人微血管内皮细胞 HMEC-1 增殖及其成管萌芽管的形成,且对斑马鱼胚胎和 C57BL/6 小鼠的血管形成均有明显的抑制作用^[23]。吉马酮抑制血管新生研究多集中在肿瘤领域,能够通过降低 VEGF 表达,调控非小细胞肺癌 NCI-H1770 细胞的增殖和凋亡^[24]。莪术醇能够下调 NF-κB 和 VEGF 表达,从而抑制人肺癌 A549 细胞增殖^[25],还可通过调控环氧合酶-2 (cyclooxygenase-2, COX-2) / 前列腺素 E2 (prostaglandin E2, PGE2) / VEGF 信号通路,抑制结肠癌裸鼠移植瘤生长^[26]。β-榄香烯能够明显抑制胃癌干细胞 GCSCs 肿瘤微血管的生成^[27]。豆甾醇能够下调肿瘤坏死因子-α (tumor necrosis factor-α, TNF-α) mRNA 表达水平,抑制小鼠肿瘤血管生成和胆管癌移植瘤生长^[28]。

PTGS2 和 VDR 是“药物-成分-靶点”网络中的关键靶点。PTGS2 是 COX 的诱导型即刻反应基因,是花生四烯酸合成前列腺素类物质的关键性限速酶,主要参与炎症反应、动脉粥样硬化、肿瘤新生等多种信号转导^[29]。研究发现,COX-2 可能以 VEGF

为重要介质诱导结直肠癌血管生成^[30], 目前虽有较多关于姜黄干预血管新生的研究, 但姜黄通过PTGS 调控血管新生的报道较少, 有待进一步验证。VDR 与 RXR 形成异源二聚体, 抑制人血管内皮细胞的凋亡, 对糖尿病合并动脉粥样硬化具有一定的保护作用^[31]。对姜黄的靶点进行 PPI 映射并构建网络, 发现 AKT1 和 ALB 是核心靶点, AKT1 负责调节代谢、细胞增殖和血管生成, 姜黄素能够通过下调 AKT 表达, 抑制大鼠实验性脉络膜新生血管生成^[32]。ALB 负责调节血液的胶体渗透压, 目前有关 ALB 直接调节血管新生的报道较少, 但 ALB 能够影响血管通透性, 高通透性血管有利于肿瘤细胞和炎性细胞的浸润以及促血管生成因子的生成和局部聚集, 提示后续可对此进行深入研究。

GO 功能和 KEGG 通路富集分析发现, 姜黄能够通过作用于 PI3K-Akt 信号通路、VEGF 信号通路、乳腺癌、膀胱癌、结直肠癌等通路, 调节蛋白质自身磷酸化、信号转导、细胞增殖、酶结合、血红素结合等功能。姜黄对癌症具有明显的改善作用, 能够抑制肿瘤细胞的增殖、迁移, 还能够延缓动脉粥样硬化进程, 但其研究多集中在姜黄单一成分或单一通路上, 忽略中药的多成分、多靶点以及中医整体观的理念, 本研究从整体性及系统性的角度阐释姜黄抗血管生成的作用。

综上所述, 姜黄挥发油、姜黄素和姜黄水提液均具有明显的抗斑马鱼血管新生的作用, 姜黄素类、倍半萜类和植物甾醇类成分可能是姜黄抗血管生成的主要活性成分, 可与 AKT、ALB、CASP3、PEGS2、VDR、PGR 等靶点以氢键作用结合, 通过 RNA 调控、蛋白质自身磷酸化、细胞功能等调节 PI3K-Akt 信号通路、VEGF 信号通路以及癌症通路等, 从而发挥抑制血管生成的作用。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] Fallah A, Sadeghinia A, Kahroba H, et al. Therapeutic targeting of angiogenesis molecular pathways in angiogenesis-dependent diseases [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 110: 775-785.

[2] Carmeliet P, Jain R K. Angiogenesis in cancer and other diseases [J]. *Nature*, 2000, 407(6801): 249-257.

[3] 杨婷, 张莉君, 黄睿, 等. 中药活性成分调控血管新生的研究进展 [J]. *药学学报*, 2020, 55(9): 1995-2007.

[4] 韦梭婷, 郝二伟, 杜正彩, 等. 基于传统性效及现代研

究的姜黄质量标志物分析 [J]. *中草药*, 2020, 51(14): 3830-3839.

[5] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 276.

[6] 廖婉, 张倩, 孙良堃, 等. 萜烯缀合姜黄素类微量成分与姜黄素类成分在不同姜黄属药材中的定性定量分析 [J]. *中草药*, 2020, 51(4): 1076-1081.

[7] 窦晓鑫, 杨玉莹, 卜志超, 等. 姜黄素逆转结直肠癌化疗耐药的药理作用机制研究进展 [J]. *药物评价研究*, 2020, 43(9): 1893-1897.

[8] Li Y Z, Tian L L, Sun D J, et al. Curcumin ameliorates atherosclerosis through upregulation of miR-126 [J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(11): 21049-21059.

[9] Bai Y H, Wang W Q, Sun G L, et al. Curcumin inhibits angiogenesis by up-regulation of microRNA-1275 and microRNA-1246: A promising therapy for treatment of corneal neovascularization [J]. *Cell Prolif*, 2016, 49(6): 751-762.

[10] Chen W X, Lu Y, Wu J M, et al. Beta-elemene inhibits melanoma growth and metastasis via suppressing vascular endothelial growth factor-mediated angiogenesis [J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2011, 67(4): 799-808.

[11] 王成, 龚莉虹, 郭朝成, 等. 模式生物斑马鱼在中药药效物质筛选中的应用进展 [J]. *中草药*, 2019, 50(24): 6125-6134.

[12] Howe K, Clark M D, Torroja C F, et al. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome [J]. *Nature*, 2013, 496(7446): 498-503.

[13] 田丽莉, 朱国福. 斑马鱼在中药研究中的应用 [J]. *中国中药杂志*, 2015, 40(5): 822-827.

[14] 郑勇凤, 汪蕾, 赵思蕾, 等. 应用自动质谱退卷稳定性系统 (AMDIS) 和保留指数分析 3 种不同基原莪术的挥发油成分差异 [J]. *中国中药杂志*, 2016, 41(2): 257-263.

[15] 郝敏, 陆兔林, 毛春芹, 等. 3 种温郁金根茎炮制品的 UPLC 指纹图谱与多成分含量测定研究 [J]. *中国中药杂志*, 2018, 43(11): 2288-2294.

[16] Isogai S, Horiguchi M, Weinstein B M. The vascular anatomy of the developing zebrafish: An atlas of embryonic and early larval development [J]. *Dev Biol*, 2001, 230(2): 278-301.

[17] 魏仙, 姚于勤, 杨金亮. 新生血管生成模型及应用 [J]. *生物技术通讯*, 2015, 26(3): 421-425.

[18] 黄燕芬, 朱学鑫, 丁志山, 等. 3 种姜黄色素抗血管生成及相关因子表达作用研究 [J]. *中国中药杂志*, 2015, 40(2): 324-329.

[19] 高文, 何彦津, 梁凤鸣. 姜黄素抗肿瘤血管生成分子机制研究进展 [J]. *国际眼科杂志*, 2016, 16(3): 466-468.

[20] 符垂师, 云川, 冯业成, 等. 姜黄素对婴儿血管瘤内皮

- 细胞增殖、凋亡的影响及机制 [J]. 中国免疫学杂志, 2020, 36(17): 2086-2090.
- [21] 王海晶. 姜黄挥发油对肺癌细胞及血管生成抑制作用的研究 [D]. 重庆: 第三军医大学, 2005.
- [22] 羊青, 晏小霞, 王茂媛, 等. 不同产地姜黄挥发油的化学成分及其抗氧化活性 [J]. 中成药, 2016, 38(5): 1188-1191.
- [23] Yue G G L, Kwok H F, Lee J K M, *et al.* Novel anti-angiogenic effects of aromatic-turmerone, essential oil isolated from spice turmeric [J]. *J Funct Foods*, 2015, 15: 243-253.
- [24] 李冰, 周平, 靳义. 吉马酮对人非小细胞肺癌 NCI-H1770 细胞增殖、凋亡、侵袭和迁移的调节作用 [J]. 中国免疫学杂志, 2019, 35(7): 819-823.
- [25] 王娟, 刁珂, 侯艳芳, 等. 莪术醇对 A549 细胞增殖、核因子- κ B 及血管内皮生长因子表达的影响 [J]. 中华中医药杂志, 2013, 28(10): 3024-3027.
- [26] 池碧霞, 王娟, 白准, 等. 莪术醇对结直肠癌细胞裸鼠移植瘤生长及其 VEGF 和 COX-2 表达的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(8): 121-125.
- [27] Yan B, Zhou Y Q, Feng S H, *et al.* β -Elemene attenuated tumor angiogenesis by targeting notch-1 in gastric cancer stem-like cells [J]. *Evid Based Compl Alternat Med*, 2013, 2013: 268468.
- [28] Kangsamaksin T, Chaithongyot S, Wootthichairangsan C, *et al.* Lupeol and stigmasterol suppress tumor angiogenesis and inhibit cholangiocarcinoma growth in mice via downregulation of tumor necrosis factor-A [J]. *PLoS One*, 2017, 12(12): e0189628.
- [29] 邓平. 环氧合酶 2 在动脉粥样硬化炎症中的意义和他汀类药物的影响 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2004, 12(2): 241-242.
- [30] 蔡瑞霞, 盛霞, 袁志浩, 等. CD105、COX-2 和 VEGF 在结直肠癌中的表达及其与血管新生的关系 [J]. 肿瘤防治研究, 2007, 34(2): 125-127.
- [31] 宋琳. 2 型糖尿病合并动脉粥样硬化危险因素的分析及其与 VDR 基因 FokI、BsmI 多态性的相关性研究 [D]. 昆明: 昆明医科大学, 2013.
- [32] 陈水龄. 姜黄素抑制实验性脉络膜新生血管的机制研究 [D]. 北京: 中国中医科学院, 2020.

[责任编辑 李亚楠]