

基于体外模拟消化、发酵和网络药理学探讨桑叶酚类物质的潜在生物学活性

黄青昕¹, 刘婷¹, 胡洪睿², 章旭¹, 潘瑶¹, 俞燕芳³, 冯建高¹, 黎小萍³, 邓泽元², 陈芳¹

1. 南昌大学公共卫生学院 江西省预防医学重点实验室, 江西 南昌 330006

2. 南昌大学 食品科学与技术国家重点实验室, 江西 南昌 330029

3. 江西省经济作物研究所, 江西 南昌 330202

摘要: **目的** 基于体外模拟消化、发酵和网络药理学探讨桑叶酚类物质对于阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD)、癌症和糖尿病 3 种疾病的潜在作用靶点, 为研究桑叶治疗多种疾病提供理论基础。**方法** 新鲜桑叶冷冻干燥粉碎后模拟体外消化及肠道微生物发酵过程, 取不同消化 (或发酵) 阶段产物, 利用 UPLC-Q-TOF-MS/MS 技术分析其中的特征酚类物质, 结合 Swiss Target Prediction 和 Genecards 数据库筛选特征酚类物质治疗 AD、癌症和糖尿病 3 种疾病的潜在作用靶点, 采用 String 平台构建蛋白相互作用 (protein-protein interaction, PPI) 网络图, 再用 Cytoscape 软件分析特征酚类物质与以上 3 种疾病作用的共同核心靶点, 并筛选出其中的主要活性组分; 通过 David 数据库对共同核心靶点进行基因本体 (gene ontology, GO) 功能和京都基因与基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 信号通路富集分析; 使用 Autodock vina 和 PyMol 软件对主要活性组分和共同核心靶点进行分子对接。**结果** 桑叶体外消化 (或发酵) 各阶段共检测到 19 种特征酚类物质, 其中主要活性组分为咖啡酸、槲皮素和山柰酚。特征酚类物质与 3 种疾病交集靶点的共同靶点有 48 种。PPI 得出特征酚类物质对 3 种疾病作用的 10 个共同核心靶点 (AKT1、TNF、EGFR、PTGS2、SRC、TLR4、CASP3、ESR1、STAT3 和 MMP9)。对核心靶点进行富集分析, 得到 120 个生物过程、11 个细胞组分、14 个分子功能和 35 条信号通路, 其中炎症相关通路占比最高。主要活性组分与核心靶点进行分子对接模拟后, 结合能均小于 -5 kcal/mol。**结论** 桑叶不同体外消化 (发酵) 过程中产生的特征酚类物质可能通过抑制慢性炎症反应对 AD、癌症和糖尿病 3 种疾病起到治疗效应。

关键词: 桑叶; 阿尔茨海默病; 糖尿病; 癌症; 体外消化; 肠道微生物发酵; 网络药理学; 咖啡酸; 槲皮素; 山柰酚

中图分类号: R284; R285 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2023)10-3205-11

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.10.018

Investigation of potential biological activity of phenols from *Mori Folium* based on *in vitro* simulated digestion, fermentation and network pharmacology

HUANG Qing-xin¹, LIU Ting¹, HU Qi-rui², ZHANG Xu¹, PAN Yao¹, YU Yan-fang³, FENG Jian-gao¹, LI Xiao-ping³, DENG Ze-yuan², CHEN Fang¹

1. Jiangxi Provincial Key Laboratory of Preventive Medicine, School of Public Health, Nanchang University, Nanchang 330006, China

2. State Key Laboratory of Food Science and Technology, Nanchang University, Nanchang 330029, China

3. Economic Crops Research Institute of Jiangxi Province, Nanchang 330202, China

Abstract: Objective To explore the potential synergistic targets of phenols from Sangye (*Mori Folium*) for Alzheimer's disease (AD), cancer and diabetes mellitus based on the *in vitro* simulated digestion, fermentation and network pharmacology, to provide the theoretical basis in the treatment of various diseases with *Mori Folium*. **Methods** After freeze-dried and pulverized, the fresh *Mori Folium* were used for *in vitro* digestion and intestinal microbial fermentation process. Different products from digestion (or fermentation) stage were analyzed to screen out the characteristic phenolic substances by UPLC-Q-TOF-MS/MS. The Swiss Target Prediction and Genecards database were used to screen the potential targets of characteristic phenolic substances in the treatment of

收稿日期: 2022-12-19

基金项目: 江西省技术创新引导类计划项目 (20212BDH81028)

作者简介: 黄青昕, 女, 硕士研究生, 主要研究方向为植物化学物的生物活性及其作用机制。E-mail: xluo45@qq.com

*通信作者: 陈芳, 女, 博士, 副教授, 主要研究方向为食品营养与健康、植物化学物的生物活性及其作用机制。E-mail: xinganchenfang@163.com

AD, cancer and diabetes mellitus. The String platform was used to establish a protein-protein interaction (PPI) network diagram. Then the common key targets between the characteristic phenolic substances and the three diseases were analyzed by Cytoscape, and the main active components were screened out. The gene ontology (GO) function and Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) signaling pathway enrichment analysis of the common core targets were performed on the David database. Finally, the molecular docking of the main active components and common core targets was performed via Autodock vina and PyMol. **Results** A total of 19 characteristic phenolic substances were detected in *in vitro* digestion (or fermentation) stage of *Mori Folium*, and the main active components were caffeic acid, quercetin and kaempferol. There were 48 common targets among the characteristic phenolic substances and the three diseases. Ten common core targets (AKT1, TNF, EGFR, PTGS2, SRC, TLR4, CASP3, ESR1, STAT3 and MMP9) between the characteristic phenolic substances and the three diseases were obtained from PPI analysis. After enrichment analysis of common core targets were performed, then 120 biological processes, 11 cell components, 14 molecular functions and 35 signaling pathways were screened out, in which inflammation-related pathways accounted for the highest proportion. The binding energy between the main active components and common core targets were lower than -5 kcal/mol during the molecular docking. **Conclusion** The characteristic phenolic substances produced during different *in vitro* digestion (fermentation) of *Mori Folium* may exert therapeutic effects on AD, cancer and diabetes, which may be mediated by inhibiting chronic inflammation.

Key words: *Mori Folium*; Alzheimer's disease; diabetes mellitus; cancer; *in vitro* digestion; fermentation of intestinal microorganisms; network pharmacology; caffeic acid; quercetin; kaempferol

桑树 *Morus alba* L. 为桑科桑属植物, 在我国有 5000 多年栽培史, 分布广泛, 遍及全国, 桑叶 *Mori Folium* 为桑树的干燥叶, 属药食同源植物^[1]。作为一种重要的中药材, 桑叶的药用价值在《神农本草经》《本草纲目》和《唐本草》等医学古籍中均有记载。现代药理学研究表明, 桑叶中含有多种化合物, 包括酚类、生物碱、植物甾醇等^[2]。酚类物质为桑叶主要活性物质, 是一种天然抗氧化剂, 可降低自由基对机体的毒性^[3]。桑叶具有降血糖、调血脂、抗氧化、抗炎、抗衰老以及抗癌等作用^[2]。

糖尿病、癌症和阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 等慢性疾病是老年人健康受损的主要原因, 研究表明, 这些慢性疾病之间存在诸多关联。糖尿病等代谢性疾病对于 AD 具有深刻的影响, 可通过多种途径导致淀粉样斑块、神经纤维缠结和 AD 其他症状的积聚^[4]。同时, 糖尿病患者较一般人群具有更高的癌症发病和死亡风险^[5], Meta 分析研究表明用于治疗 2 型糖尿病的一线药物二甲双胍能降低多种癌症发病率和死亡率^[6]。而癌症与 AD 之间的关系则更具复杂性, 一方面, 大量流行病学研究表明, 癌症与 AD 的发病风险呈负相关; 另一方面, 癌症与 AD 的危险因素中又存在大量重叠, 如年龄和慢性炎症等^[7]。已有研究表明桑叶对于人体肥胖和糖尿病具有防治作用^[8-9], 而桑叶对于 AD 和癌症的作用及其机制的研究尚不完善。

本研究基于体外模拟消化、发酵和网络药理学探讨桑叶酚类物质对 AD、癌症和糖尿病 3 种疾病的潜在治疗作用, 探寻桑叶特征酚类物质作用于 3

种疾病的共同靶点和作用机制, 从而为实现桑叶治疗多种疾病提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

液相色谱-G6500 系列四极杆-飞行时间质谱联用仪 (美国安捷伦科技有限公司); YQX-II 厌氧培养箱 (上海跃进医疗器械有限公司); α -淀粉酶 (A298990)、胃蛋白酶 (P110928)、阿拉伯半乳糖 (A304929)、酪蛋白 (C288596)、瓜尔豆胶 (G109238)、木聚糖 (X140487)、L-半胱氨酸 (C108237) 等购于上海阿拉丁公司; 胰酶 (T8151) 和猪胆盐 (G8310) 购于北京索莱宝科技有限公司; 色谱纯乙腈、乙酸和甲酸购于德国 Merck 公司; 新鲜桑叶采自江西省蚕桑茶叶研究所桑树品种园, 经南昌大学陈芳副教授鉴定为桑 *M. alba* L. 的干燥叶, 经冷冻干燥后粉碎过 60 目筛得冻干桑叶粉。

1.2 体外模拟口腔-胃-肠道消化

参照 Hu 等^[10]的方法进行体外模拟消化。取 1 g 冻干桑叶粉, 依次加模拟口腔消化工作液、 α -淀粉酶和氯化钙进行模拟口腔消化, 5 min 后模拟口腔消化结束; 再加入模拟胃消化工作液、胃蛋白酶和氯化钙并调节 pH 3.0 进行模拟胃消化, 2 h 后模拟胃消化结束; 加入小肠消化工作液、胰蛋白酶、猪胆盐和氯化钙并调节 pH 7.0 进行 2 h 模拟小肠消化。将各阶段得到的模拟消化产物 4000 r/min 离心 10 min, 上清液为各阶段消化液, 沉淀为消化渣。分别取 2 mL 各阶段消化液, 加入同等体积的无水乙醇, 0.22 μ m 滤膜滤过后测定酚类化合物。

1.3 体外肠道微生物发酵

参考 Hu 等^[10]的方法进行体外肠道微生物发酵。取上述模拟小肠消化渣 0.2 g, 加入生长培养基和粪便菌悬液后 37 °C 厌氧培养, 分别于发酵 0、1、3、6、12 和 24 h 时收集 2 mL 发酵液, 加入乙腈终止反应后加入等体积 70%乙醇, 超声后 4500 r/min 离心 10 min, 取上清液, 0.22 μm 滤膜滤过后测定酚类化合物。

1.4 各消化(或发酵)阶段桑叶酚类物质的定性分析

采用 UPLC-QTOF-MS/MS 对桑叶体外模拟消化(或发酵)各阶段产生的酚类物质进行定性分析。

1.4.1 色谱条件 Eclipse Plus C₁₈ 色谱柱(100 mm×1.8 mm, 3 μm); 流动相为 0.1%甲酸水溶液(A)和乙腈(B), 洗脱梯度: 0~8 min, 10%~15% B; 8~20 min, 15%~35% B; 20~24 min, 35%~50% B; 24~28 min, 50%~70% B; 28~33 min, 70%~10% B; 进样量 5 μL; 体积流量 0.34 mL/min。

1.4.2 质谱条件 一级质谱(MS)参数: 电喷雾离子源, 气帘气 275.8 kPa, 雾化气和辅助气 344.7 kPa, 离子源温度 550 °C, 喷雾电压-4500 V, 去簇电压 80 V, 碰撞能 10 eV, 负离子 IDA 模式扫描(*m/z* 100~1700)采集数据; 二级质谱(MS2)参数: 去簇电压 80 V, 碰撞能(30±15) eV, 负离子模式扫描(*m/z* 50~1000)采集碎片离子^[11]。

分析各消化液(或发酵液)的总离子流图, 利用高分辨质谱的精确相对分子质量信息推测化合物的分子式, 参照文献报道的各类化合物裂解规律与碎片信息, 与二级质谱的碎片信息进行比对, 鉴定出桑叶体外模拟消化(或发酵)各阶段产生的酚类物质。

1.5 网络药理学分析

根据质谱化合物成分分析, 鉴定桑叶体外消化及肠道微生物发酵过程中各阶段的特征酚类物质。通过 PubChem 数据库^[12](<https://pubchem.i.nlm.nih.gov/>)和 Swiss Target Prediction 数据库^[13](<http://www.swisstargetprediction.ch/>)筛选后(probability>0)获得化合物靶点。通过 Genecards 数据库^[14](<https://www.genecards.org/>)搜索“cancer”“Alzheimer's disease”和“diabetes mellitus”, 筛选后(score≥7)获得疾病靶点。

将特征酚类物质靶点分别与癌症、AD 和糖尿病靶点利用 Venny2.1(<https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/>)取交集, 将交集靶点导入 Cytoscape 3.8.0 软件, 分析构建“酚类物质-预测靶点-疾病”

网络, 鉴定出主要活性酚类物质。

将特征酚类物质靶点与 3 种疾病的交集靶点, 输入至 String 数据库中, 设定物种为“Homo sapiens”, 导出蛋白互作文件并将其导入 Cytoscape 3.8.0 软件, 构建特征酚类物质与疾病交集靶点的蛋白相互作用网络(protein-protein interaction, PPI), 按照度(degree)≥2 倍中位数筛选核心靶点。

利用 DAVID 数据库^[15]对特征酚类物质与癌症、AD 和糖尿病 3 种疾病的核心靶点中重合部分进行基因本体(gene ontology, GO)功能富集和京都基因与基因组百科全书(Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)通路富集分析。

1.6 分子对接

将上述主要活性酚类物质分别与共同核心靶点进行分子对接。在 PubChem 数据库(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>)下载主要活性酚类物质 2D 结构, 并将其导入 Chem3D 转为最小键能的 3D 结构, 同时在 RCSB 数据库(<https://www.rcsb.org>)获取核心靶点蛋白 3D 结构, 使用 Autodock Tools 1.5.7 和 Vina 软件进行分子对接, 得到结合能数据, 并与靶点及其自身配体的结合能数据进行比较后进行评价; 使用 Pymol 2.3.4 对对接结果进行可视化。

2 结果

2.1 桑叶在体外模拟消化和肠道微生物发酵过程中特征酚类物质的鉴定

由于模拟口腔消化时间较短(仅为 5 min), 前期实验发现模拟口腔消化后的酚类物质与消化前几乎没有变化, 主要的变化均在模拟胃、肠消化及体外微生物发酵过程发生, 因此没有检测模拟口腔消化上清液中的酚类物质。在相同色谱、质谱条件下, 根据保留时间、精确相对分子质量和二级质谱裂解碎片来鉴定和推测特征酚类物质。正、负离子模式扫描下, 共鉴定出 19 种特征酚类物质, 如表 1 所示。其中, 咖啡醌、槲皮素和山柰酚在体外发酵阶段才出现, 由绿原酸、芦丁、异槲皮素及紫云英苷等分解而来。

2.2 药物-疾病交集靶点

通过 PubChem 数据库和 Swiss Target Prediction 数据库获取特征酚类物质的靶点(probability>0), 除重后共计 221 个。通过 Genecards 数据库搜索疾病靶点, 设置筛选条件为 score≥7, 获得癌症、AD 和糖尿病的相关靶点分别为 1862、2307 和 1081 个。

将特征酚类物质靶点与疾病靶点导入 Venny 网站取交集, 如图 1-A~C 所示, 获得特征酚类物质

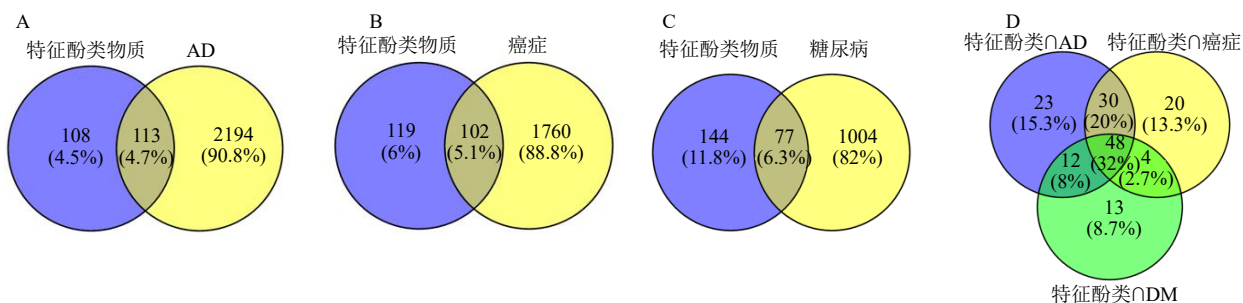
表 1 桑叶在体外模拟消化和肠道微生物发酵过程中主要酚类成分的鉴定

Table 1 Identification of major phenolic compounds in *Mori Folium* during simulated gastrointestinal digestion and colonic fermentation *in vitro*

编号	t_R/min	$[M-H]^-$ (m/z)	MS ² 主要碎片离子 (m/z)	化合物	消化过程
SY1	0.863	191.056 6	191.056 3, 111.009 0, 87.009 0, 85.029 8	奎宁酸 (quinic acid)	G、I、F
SY2	1.932	353.089 2	191.055 8, 135.045 5, 85.029 4	绿原酸 (chlorogenic acid)	G、I、F
SY3	2.030	179.051 0	135.044 2, 134.037 2, 136.923 6	咖啡酸 (caffeic acid)	G、I、F
SY4	2.741	353.089 0	191.057 4	新绿原酸 (5-caffeoylquinic acid)	G、I、F
SY5	3.811	177.012 8	135.915 6, 89.039 3, 105.035 0, 136.922 1	咖啡醌 (caffeoquinone)	F
SY6	4.669	609.146 5	447.092 4, 285.040 1, 283.026 9	山柰酚-3,7-二-O-葡萄糖苷 (kaempferol-3,7-di-O-glucoside)	G、I、F
SY7	6.935	625.141 7	463.086 6, 300.028 1	白麻苷 (quercetin 3-O-sophoroside)	G、I、F
SY8	9.952	609.147 9	300.028 1	芦丁 (rutin)	G、I、F
SY9	10.671	463.090 1	300.028 3	异槲皮素 (quercetin 3-O-glucoside)	G、I、F
SY10	11.723	505.099 3	300.027 9, 301.033 5	槲皮素-3-O-(6"-乙酰葡萄糖苷) [quercetin 3-O-(6"-acetyl-glucoside)]	G、I、F
SY11	11.793	549.089 8	505.100 0, 300.028 3	槲皮素-3-O-丙二酰葡萄糖苷 (quercetin 3-O-malonylglucoside)	G、I、F
SY12	11.88	593.152 6	285.040 5	山柰酚-3-O-葡萄糖基-(1→2)-鼠李糖苷 [kaempferol 3-O-glucosyl-(1→2)-rhamnoside]	G、I、F
SY13	12.355	447.094 5	284.033 1, 285.039 1, 255.030 2, 227.035 3	紫云英苷 (astragalin)	G、I、F
SY14	12.362	515.118 9	353.089 9, 191.055 7, 179.034 1, 173.045 0, 135.045 4	二咖啡酰奎宁酸 (dicaffeoylquinic acid)	G
SY15	13.073	447.095 3	284.032 9, 151.004 2, 107.014 0, 164.012 0, 285.037 7	山柰酚-7-O-葡萄糖苷 (kaempferol 7-O-glucoside)	I、F
SY16	13.565	489.105 3	284.033 1, 285.039 1, 255.030 2, 227.035 3	山柰酚-3-(6-乙酰半乳糖苷) [kaempferol 3-(6-acetylgalactoside)]	G、I、F
SY17	13.967	533.093 4	489.103 5, 285.040 6	山柰酚-丙二酰葡萄糖苷 (kaempferol-malonyl-glucoside)	G
SY18	16.569	301.036 4	151.004 2, 121.030 0, 107.014 6	槲皮素 (quercetin)	F
SY19	19.278	285.041 6	93.034 8	山柰酚 (kaempferol)	F

G-模拟胃消化上清液 I-模拟肠消化上清液 F-体外肠道微生物发酵液 (发酵液所有取样时段中只要有一个时段检测到即视为含有)

G-simulated gastric digestion supernatant I-simulated intestinal digestion supernatant F-*in vitro* intestinal microbial fermentation broth (considered to be contained if detected in one of all sampling periods)



A~C-特征酚类物质分别与AD、癌症和糖尿病交集靶点 D-特征酚类物质对3种疾病的共同作用靶点

A-C-intersection targets of characteristic phenolic substances with AD, cancer and diabetes mellitus, respectively D-joint target of characteristic phenolic substances on three diseases

图 1 特征酚类物质与疾病的交集靶点 Venn 图

Fig. 1 Venn diagram of intersection targets between characteristic phenolic substances and disease

与 AD、癌症和糖尿病的交集靶点分别为 113、102 和 77 个。如图 1-D 所示，将特征酚类物质与 3 种疾病的交集靶点再取交集，得到特征酚类物质对 3 种疾病的共同作用靶点，共计 48 个。

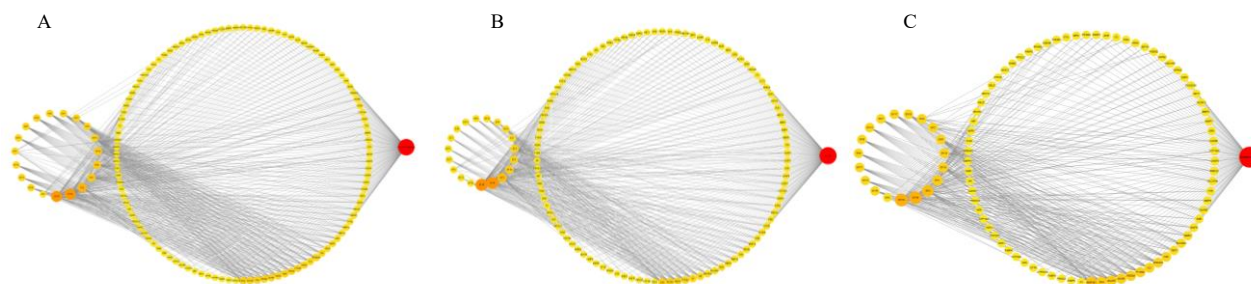
2.3 药物-预测靶点-疾病网络

将特征酚类物质与疾病预测靶点导入 Cytoscape 绘制特征酚类物质-预测靶点-疾病网络，如图 2-A~C 所示。按度值 ≥ 2 倍中位数筛选出主要活性成分：咖啡酸 (SY3)、槲皮素 (SY18) 和山柰酚 (SY19)。

2.4 药物-疾病交集靶点 PPI 网络

如图 3-A 所示，AD 与特征酚类物质的交集蛋白共 113 个，通过 String 数据库和 Cytoscape 软件分析得到核心靶点 (度值 ≥ 2 倍中位数)：丝氨酸/苏氨酸激酶 1 (serine/threonine-protein kinase 1, AKT1)、肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor, TNF)、酪氨酸蛋白激酶 (non-receptor tyrosine kinase,

SRC)、表皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor, EGFR)、胱天蛋白酶 3 (caspase-3, CASP3)、信号转导和转录激活因子 3 (signal transducer and activator of transcription 3, STAT3)、雌激素受体 α (estrogen receptor 1, ESR1)、PTGS2 (prostaglandin-endoperoxide synthase 2, 前列腺素内过氧化物合酶 2)、基质金属蛋白酶 9 (matrix metalloproteinase 9, MMP9)、丝裂原活化蛋白激酶 1 (mitogen-activated protein kinase 1, MAPK1)、Toll 样受体 4 (Toll-like receptor 4, TLR4)、人表皮生长因子受体 2 (human epidermal growth factor receptor 2, ERBB2)、磷脂酰肌醇-4,5-二磷酸 3-激酶催化亚基 α (phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha, PIK3CA)。如图 3-B 所示，癌症与特征酚类物质的交集靶点共 102 个，核心靶点为 AKT1、TNF、EGFR、CASP3、ESR1、SRC、STAT3、ERBB2、PTGS2、MMP9、

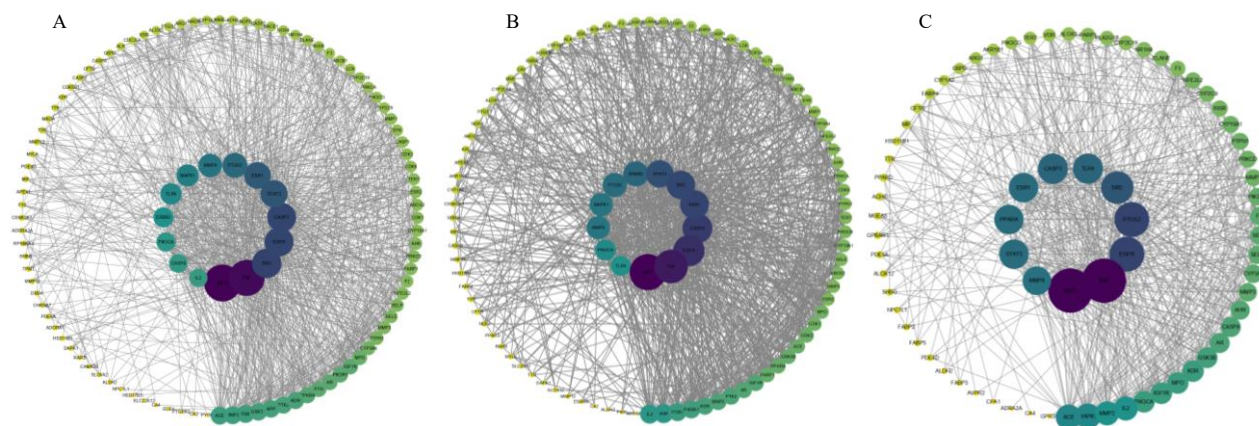


A~C-特征酚类物质分别与 AD、癌症和糖尿病的预测靶点网络图

A—C-predicted target network diagram of characteristic phenolics and AD, cancer and diabetes mellitus, respectively

图 2 特征酚类物质-预测靶点-疾病网络图

Fig. 2 Network diagram of characteristic phenolics-prediction target-disease



A~C-特征酚类物质分别与 AD、癌症和糖尿病的交集靶点 PPI

A—C-PPI of intersection targets of characteristic phenolics with AD, cancer and diabetes mellitus, respectively

图 3 特征酚类物质与疾病交集靶点 PPI 网络图

Fig. 3 PPI network diagram of intersection target of characteristic phenolic substances and disease

MAPK1、PIK3CA、TLR4。如图 3-C 所示，糖尿病与特征酚类物质的交集靶点共 77 个，核心靶点为 AKT1、TNF、EGFR、PTGS2、SRC、TLR4、CASP3、ESR1、过氧化物酶体增殖物激活受体 α (peroxisome proliferator-activated receptor α , PPARA)、STAT3、MMP9。特征酚类物质可能作用于 3 种疾病的共同核心靶点 (后称共同核心靶点): AKT1、TNF、EGFR、PTGS2、SRC、TLR4、CASP3、ESR1、STAT3、MMP9。

2.5 GO 功能与 KEGG 信号通路富集分析

利用 DAVID 对共同核心靶点进行 GO 功能富

集分析，以 $P < 0.05$ 为筛选条件获得生物过程 (biological process, BP)、细胞组分 (cellular component, CC)、分子功能 (molecular function, MF) 分别为 120、11、14 条。由图 4 可知，特征酚类物质对共同核心靶点的 BP 多富集在一氧化氮生物合成过程的正调节 (positive regulation of nitric oxide biosynthetic process)、凋亡过程的调节 (regulation of apoptotic process)、活性氧的细胞反应 (cellular response to reactive oxygen species) 等; CC 主要为膜筏 (membrane raft)、大分子复合物

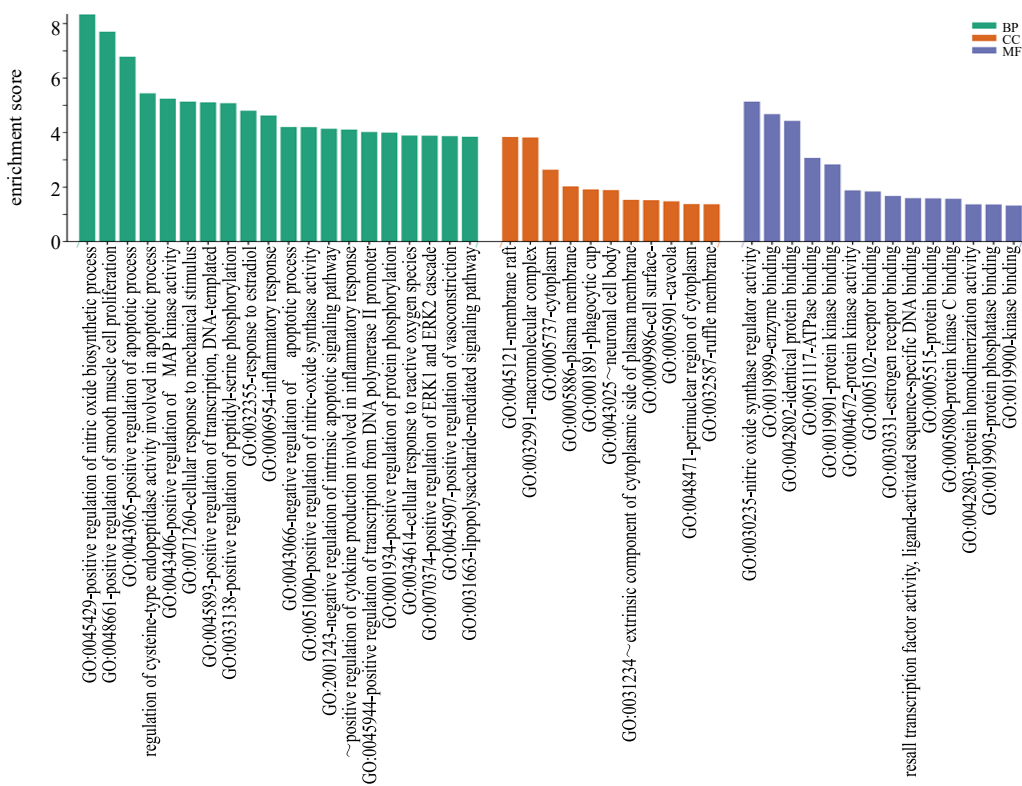


图 4 桑叶酚类物质对 3 种疾病作用的核心靶点 GO 分析

Fig. 4 GO analysis of common key targets of *Mori Folium* phenols acting on three diseases

(macromolecular complex)、细胞质 (cytoplasm)、质膜 (plasma membrane) 等; MF 主要为一氧化氮合酶调节器活性 (nitric-oxide synthase regulator activity)、酶结合 (enzyme binding)、蛋白质结合 (protein binding) 等。

利用 DAVID 对共同核心靶点进行 KEGG 信号通路富集，以 $P < 0.05$ 为筛选条件，得到 35 条信号通路，主要与癌症、炎症、感染、糖尿病、AD 等有关。由图 5 可知，共同核心靶点的主要信号通路显著富集在 TNF 信号通路 (TNF signaling pathway)、白细胞介素 -17 信号通路 (interleukin-17 signaling

pathway)、核因子- κ B (nuclear factor kappa-B, NF- κ B) 信号通路 (NF-kappa B signaling pathway) 和 Toll 样受体信号通路 (Toll-like receptor signaling pathway) 等炎症相关通路。

2.6 分子对接

将主要活性组分咖啡酸、槲皮素和山柰酚分别与共同核心靶点 AKT1 (7NH5)、TNF- α (6X85)、EGFR (1IVO)、PTGS2 (5F1A)、SRC (1FMK)、TLR4 (2Z62)、CASP3 (1GFW)、ESR1 (1ERE)、STAT3 (6TLC)、MMP9 (1L6J) 进行分子对接。共 30 组对接结果，所有组合对接结合能均小于 -5 kcal/mol

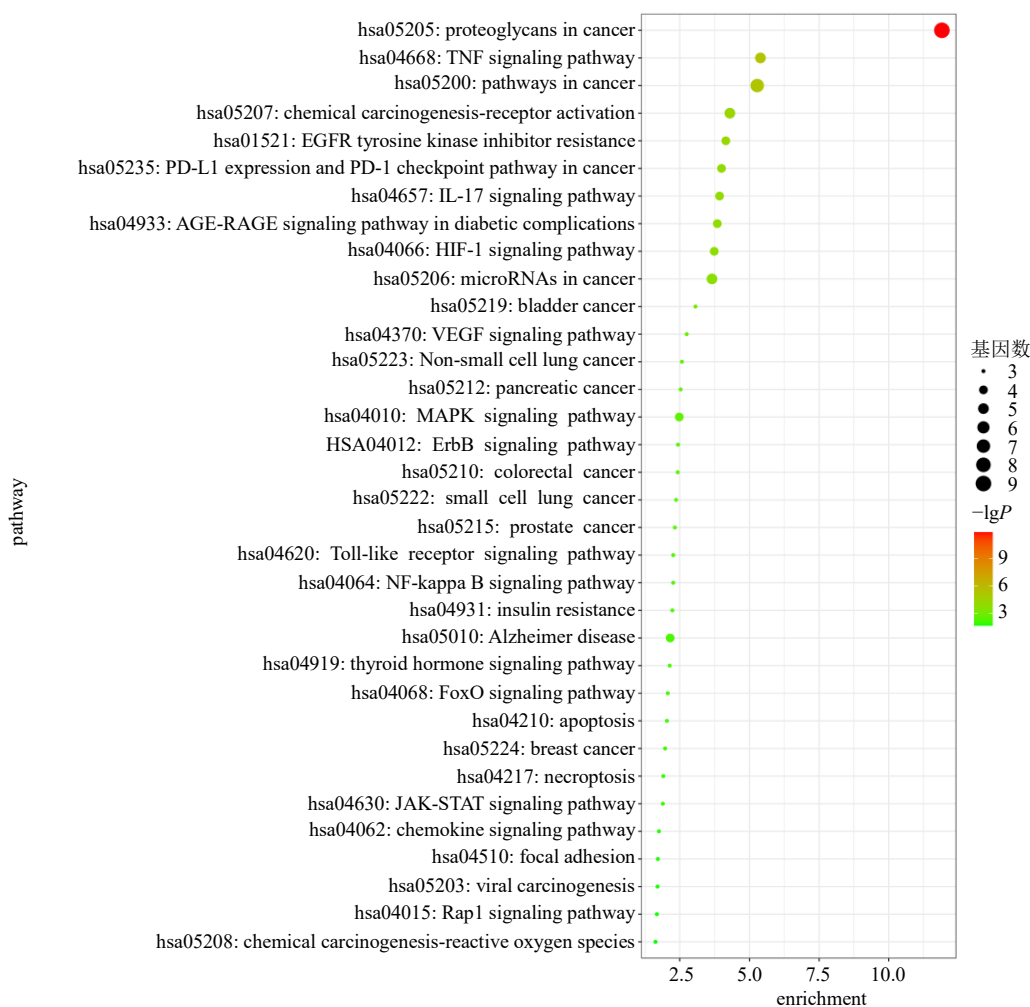


图 5 桑叶酚类物质对 3 种疾病作用的核心靶点 KEGG 分析

Fig. 5 KEGG analysis of common key targets of mulberry leaf phenolic effects on three diseases

(1 kcal=4.2 kJ), 小于-7 kcal/mol 的对接组合有 23 组, 占有对接组合的 76.7%, 其中结合能最低的是 AKT1-槲皮素 (-10.4 kcal/mol), 结合能最高的是 CASP3-咖啡酸 (-5.8 kcal/mol); 所有组合平均结合能为-7.78 kcal/mol。对接评分结果如图 6 所示, 与相应靶点自身配体结合能相比, 咖啡酸、槲皮素和山柰酚与 10 个共同核心靶点都具有较好结合活性, 可为进一步研究提供数据支撑。选取每种酚类物质与靶点自身配体结合能之比最高的蛋白展示其对接位点, 分别是咖啡酸与 MMP9、山柰酚与 AKT1 和槲皮素与 AKT1, 见图 7。咖啡酸与 MMP9 通过其残基 TYR-420、THR-426、PRO-430 相互作用; 山柰酚与 AKT1 通过其残基 ASN-204、SER-205、THR-291 相互作用; 槲皮素与 AKT1 通过其残基 ASN-204、SER-205、THR-211 及 ILE-290 相互作用。

3 讨论

AD、癌症和糖尿病作为衰老相关性疾病, 对人类健康造成了极大威胁, 面对日益加重的人口老龄化社会问题, 衰老相关性疾病的疾病负担将越来越沉重。许多研究表明, 慢性炎症与 AD、癌症和糖尿病之间存在正相关关系。慢性炎症对癌症的发展起促进作用, 同时慢性炎症在 AD 中能增强神经元细胞死亡和脑组织变性^[7], 低等程度慢性炎症能诱导胰岛素抵抗从而引发 2 型糖尿病^[16]。而现有大量研究表明, 桑叶具有抗炎、抗衰老作用, 同时对糖尿病和 AD 等疾病具有治疗效应。为了探索桑叶对于 AD、癌症和糖尿病 3 种疾病的可能作用机制, 本研究利用模拟体外消化、肠道微生物发酵和网络药理学分析进行了探究。

经分析, 在桑叶各消化(或发酵)阶段检测到的特征酚类物质有 19 种, 其中主要活性组分为槲

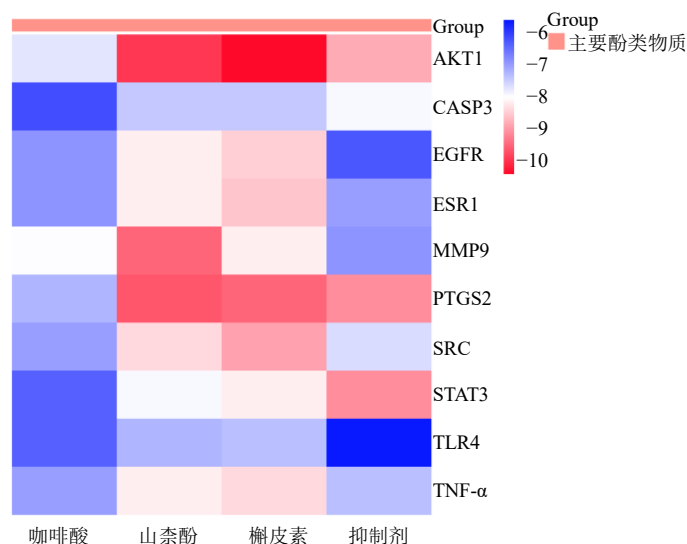


图 6 主要酚类物质与核心靶点分子对接热图

Fig. 6 Heat map of docking energy of major phenolic substances with key target molecules

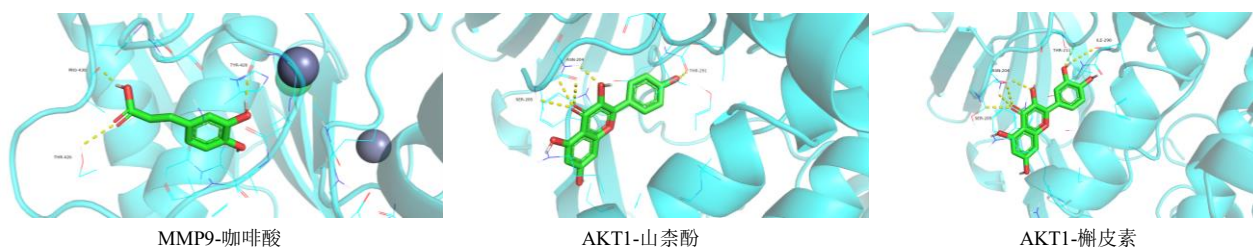


图 7 部分主要酚类物质与核心靶点分子对接结果

Fig. 7 Partial molecules docking results of major phenolic substances with key targets

皮素、山柰酚和咖啡酸。特征酚类物质对 3 种疾病作用的核心靶点共 10 个: AKT1、TNF、EGFR、PTGS2、SRC、TLR4、CASP3、ESR1、STAT3、MMP9, 其中除 STAT3 和 ESR1 外, 其他靶点都是为人熟知的炎症相关靶点, 而 STAT3 也被报道与 NF-κB 信号通路一起将炎症与癌症联系起来^[17]。共同核心靶点 KEGG 分析结果中炎症相关通路占比较大, 如 TNF 信号通路、IL-17 信号通路、NF-κB 信号通路和 Toll 样受体信号通路等, 同时大量研究报道桑叶具有抗炎作用, 这可能是桑叶治疗 3 种疾病的关键。

研究表明, 咖啡酸可能通过 AKT1、MMP9、TLR4、ESR1、STAT3、PTGS2 和 EGFR 等靶点作用于 AD、癌症和糖尿病, 如图 6 所示, 咖啡酸与这些蛋白结合良好。已有研究表明, 咖啡酸及其衍生物对于炎症具有良好的治疗效应, 其机制包括靶向 NF-κB、COX-2 (PTGS2) 等靶点^[18-19]。此外, 咖啡酸及其衍生物还能通过解聚成熟纤维而抑制 AD^[20], 可通过提高活性氧水平 (BP 富集结果之一)

和损害线粒体功能诱导癌细胞凋亡^[21], 以及通过抑制 MMP9 和血管内皮生长因子 (Vascular endothelial growth factor, VEGF) (KEGG 信号通路富集结果之一) 的表达抑制癌细胞的上皮细胞间充质化以及癌症新生血管生成^[22-23], 从而有利于抑制肿瘤的侵袭。同时咖啡酸还可以通过作用于 AKT1, 调节改善 2 型糖尿病及其并发症症状^[24-25]。

本研究通过网络药理学分析得知槲皮素可能通过 SRC、EGFR、CASP3、MMP9、PTGS2 和 AKT1 等靶点作用于 AD、癌症和糖尿病, 分子对接结果也显示槲皮素与这些靶点具有较低的结合能。现有研究表明, 槲皮素具有强大的抗炎、抗癌作用, 主要通过靶向 CASP3、MMPs、AKT 等靶点, 减少细胞内活性氧、促进凋亡、诱导巨噬细胞的 M2 极化、抑制细胞侵袭迁移和血管生成等机制发挥作用^[26-28]。槲皮素也具有抗 AD 作用, 主要通过抑制淀粉样 β 蛋白原纤维形成, 对抗细胞裂解和炎症级联途径实现^[29]。槲皮素还可以通过降低 COX2 (PTGS2) 等炎症相

关蛋白表达改善 2 型糖尿病及其并发症症状^[30]。

网络药理学分析结果显示, 山柰酚可能通过 AKT1、MMP9、EGFR 等靶点作用于 3 种疾病, 其与这些蛋白分子对接结果也显示亲和性良好。山柰酚在体内外均表现出了活跃的抗炎特性^[31], 同时还具有强大的抗癌能力^[32], 能够抑制 AKT1 磷酸化介导的上皮-间质化转换 (epithelial-mesenchymal transition, EMT), 从而抑制肺癌细胞迁移和侵袭^[33]。山柰酚还能提高谷氨酸能和胆碱能神经元的存活率和功能性, 消除淀粉样 β 和 tau 蛋白异常, 治疗 AD^[34], 也可以促进胰高糖素样肽-1 (glucagon-like peptide-1,

GLP-1) 和胰岛素释放以治疗小鼠糖尿病^[35]。

桑叶特征酚类物质中的 3 种主要活性组分都具有较强抗炎作用, 本研究的网络药理学结果与现有研究均证明这 3 种物质均具有抗 AD、癌症和糖尿病的作用。桑叶特征酚类物质作用于 3 种疾病的共同核心靶点与部分 KEGG 富集通路之间的关系见图 8, 绝大多数共同核心靶点都与炎症通路相关, 而这些靶点也分别参与 3 种疾病的调控。而大量研究表明, 慢性炎症与 AD、癌症和糖尿病的发生发展有关^[36], 因此, 桑叶特征酚类物质可能是通过抑制慢性炎症来抑制 AD、癌症及糖尿病的发生发展。

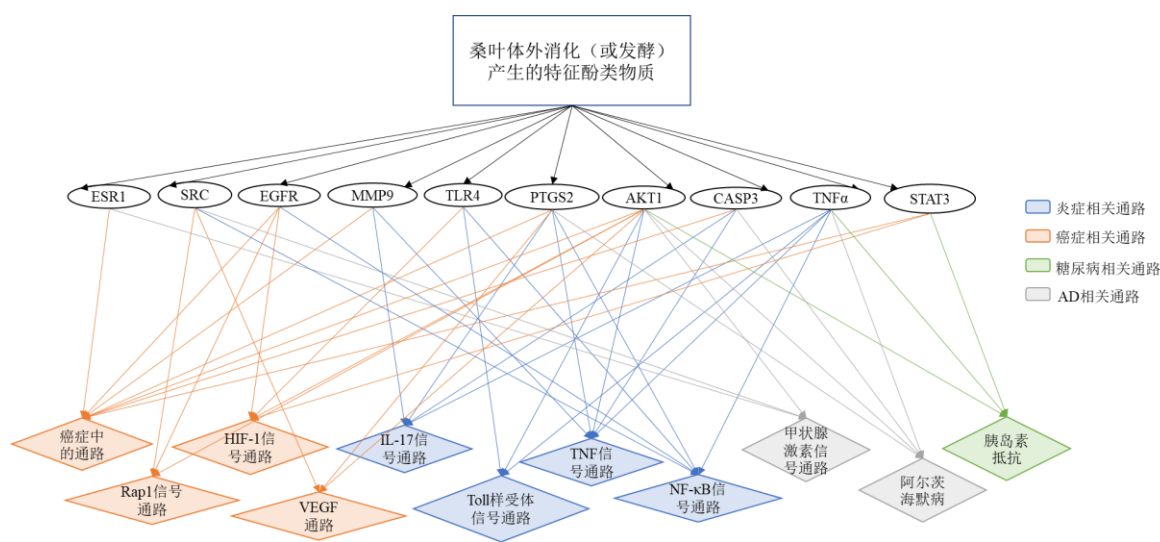


图 8 特征酚类物质对 AD、癌症和糖尿病的可能作用机制

Fig. 8 Possible mechanisms of action of characteristic phenolic substances on AD, cancer, and diabetes

目前, 桑叶治疗糖尿病的作用较多, 而桑叶对于 AD 和癌症的研究较少, 本研究提示桑叶对于 AD 和癌症的作用及机制值得探究。同时 3 种疾病中出现的大量重合靶点, 提示同一机制在 3 种疾病中可能存在不同作用, 这也值得进一步探究。

4 结论

本研究通过体外模拟消化及肠道微生物发酵及网络药理学分析发现桑叶体外消化 (发酵) 过程中产生的特征酚类物质包括咖啡酸、槲皮素和山柰酚等, 对 AD、癌症和糖尿病这 3 种疾病均可能具有治疗效应, 这可能是通过作用于 AKT1、TNF、EGFR、PTGS2、SRC、TLR4、CASP3、ESR1、STAT3、MMP9 等靶点抑制炎症反应达到的, 为实现桑叶治疗多种疾病提供了理论依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 范浩, 庄愉. 桑叶药食同源开发应用研究进展 [J]. 现代农业科技, 2017(14): 78-79.
- [2] 李来成, 张士凯, 许方舟, 等. 桑叶综合利用的研究进展 [J]. 食品工业科技, 2022, 43(2): 397-404.
- [3] 沈维治, 廖森泰, 邹宇晓, 等. 不同类型桑种质资源的桑叶总多酚及单体酚类物质含量测定 [J]. 蚕业科学, 2014, 40(3): 493-497.
- [4] Ebrahimpour S, Zakeri M, Esmacili A. Crosstalk between obesity, diabetes, and Alzheimer's disease: Introducing quercetin as an effective triple herbal medicine [J]. *Ageing Res Rev*, 2020, 62: 101095.
- [5] Gallagher E J, LeRoith D. Obesity and diabetes: The increased risk of cancer and cancer-related mortality [J]. *Physiol Rev*, 2015, 95(3): 727-748.
- [6] Shlomai G, Neel B, LeRoith D, et al. Type 2 diabetes

- mellitus and cancer: The role of pharmacotherapy [J]. *J Clin Oncol*, 2016, 34(35): 4261-4269.
- [7] Zabłocka A, Kazana W, Sochocka M, et al. Inverse correlation between Alzheimer's disease and cancer: Short overview [J]. *Mol Neurobiol*, 2021, 58(12): 6335-6349.
- [8] Peng C H, Lin H T, Chung D J, et al. Mulberry Leaf Extracts prevent obesity-induced NAFLD with regulating adipocytokines, inflammation and oxidative stress [J]. *J Food Drug Anal*, 2018, 26(2): 778-787.
- [9] Zhang L W, Su S L, Zhu Y, et al. Mulberry leaf active components alleviate type 2 diabetes and its liver and kidney injury in db/db mice through insulin receptor and TGF- β /Smads signaling pathway [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 112: 108675.
- [10] Hu Q R, Lai P W, Chen F, et al. Whole mulberry leaves as a promising functional food: From the alteration of phenolic compounds during spray drying and *in vitro* digestion [J]. *J Food Sci*, 2022, 87(3): 1230-1243.
- [11] 胡淇睿. 喷雾干燥桑叶粉的制备及其多酚在体外消化过程中的变化 [D]. 南昌: 南昌大学, 2021.
- [12] Kim S, Chen J, Cheng T J, et al. PubChem in 2021: New data content and improved web interfaces [J]. *Nucleic Acids Res*, 2021, 49(D1): D1388-D1395.
- [13] Daina A, Michielin O, Zoete V. SwissTargetPrediction: Updated data and new features for efficient prediction of protein targets of small molecules [J]. *Nucleic Acids Res*, 2019, 47(W1): W357-W364.
- [14] Rappaport N, Twik M, Plaschkes I, et al. MalaCards: An amalgamated human disease compendium with diverse clinical and genetic annotation and structured search [J]. *Nucleic Acids Res*, 2017, 45(D1): D877-D887.
- [15] Sherman B T, Hao M, Qiu J, et al. DAVID: A web server for functional enrichment analysis and functional annotation of gene lists (2021 update) [J]. *Nucleic Acids Res*, 2022, 50(W1): W216-W221.
- [16] Lontchi-Yimagou E, Sobngwi E, Matsha T E, et al. Diabetes mellitus and inflammation [J]. *Curr Diab Rep*, 2013, 13(3): 435-444.
- [17] Fan Y H, Mao R F, Yang J H. NF- κ B and STAT3 signaling pathways collaboratively link inflammation to cancer [J]. *Protein Cell*, 2013, 4(3): 176-185.
- [18] Zielińska D, Zieliński H, Laparra-Llopis J M, et al. Caffeic acid modulates processes associated with intestinal inflammation [J]. *Nutrients*, 2021, 13(2): 554.
- [19] Murtaza G, Sajjad A, Mehmood Z, et al. Possible molecular targets for therapeutic applications of caffeic acid phenethyl ester in inflammation and cancer [J]. *J Food Drug Anal*, 2015, 23(1): 11-18.
- [20] Andrade S, Loureiro J A, Pereira M C. Caffeic acid for the prevention and treatment of Alzheimer's disease: The effect of lipid membranes on the inhibition of aggregation and disruption of A β fibrils [J]. *Int J Biol Macromol*, 2021, 190: 853-861.
- [21] Mirzaei S, Gholami M H, Zabolian A, et al. Caffeic acid and its derivatives as potential modulators of oncogenic molecular pathways: New hope in the fight against cancer [J]. *Pharmacol Res*, 2021, 171: 105759.
- [22] Kosova F, Kurt F O, Olmez E, et al. Effects of caffeic acid phenethyl ester on matrix molecules and angiogenic and anti-angiogenic factors in gastric cancer cells cultured on different substrates [J]. *Biotech Histochem*, 2016, 91(1): 38-47.
- [23] Fikry E M, Gad A M, Eid A H, et al. Caffeic acid and ellagic acid ameliorate adjuvant-induced arthritis in rats via targeting inflammatory signals, chitinase-3-like protein-1 and angiogenesis [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 110: 878-886.
- [24] Bhattacharya S, Oksbjerg N, Young J F, et al. Caffeic acid, naringenin and quercetin enhance glucose-stimulated insulin secretion and glucose sensitivity in INS-1E cells [J]. *Diabetes Obes Metab*, 2014, 16(7): 602-612.
- [25] Oršolić N, Sirovina D, Odeh D, et al. Efficacy of caffeic acid on diabetes and its complications in the mouse [J]. *Molecules*, 2021, 26(11): 3262.
- [26] Hu Y, Gui Z P, Zhou Y N, et al. Quercetin alleviates rat osteoarthritis by inhibiting inflammation and apoptosis of chondrocytes, modulating synovial macrophages polarization to M2 macrophages [J]. *Free Radic Biol Med*, 2019, 145: 146-160.
- [27] Kim W K, Bang M H, Kim E S, et al. Quercetin decreases the expression of ErbB2 and ErbB3 proteins in HT-29 human colon cancer cells [J]. *J Nutr Biochem*, 2005, 16(3): 155-162.
- [28] Liu Y, Li C L, Xu Q Q, et al. Quercetin inhibits invasion and angiogenesis of esophageal cancer cells [J]. *Pathol Res Pract*, 2021, 222: 153455.
- [29] Khan H, Ullah H, Aschner M, et al. Neuroprotective effects of quercetin in Alzheimer's disease [J]. *Biomolecules*, 2019, 10(1): 59.
- [30] Woo M, Kim M J, Song Y O. Bioactive compounds in kimchi improve the cognitive and memory functions impaired by amyloid beta [J]. *Nutrients*, 2018, 10(10):

- 1554.
- [31] Devi K P, Malar D S, Nabavi S F, *et al.* Kaempferol and inflammation: From chemistry to medicine [J]. *Pharmacol Res*, 2015, 99: 1-10.
- [32] Kim T W, Lee S Y, Kim M, *et al.* Kaempferol induces autophagic cell death via IRE1-JNK-CHOP pathway and inhibition of G9a in gastric cancer cells [J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9(9): 875.
- [33] Jo E, Park S J, Choi Y S, *et al.* Kaempferol suppresses transforming growth factor- β 1-induced epithelial-to-mesenchymal transition and migration of A549 lung cancer cells by inhibiting Akt1-mediated phosphorylation of Smad3 at threonine-179 [J]. *Neoplasia*, 2015, 17(7): 525-537.
- [34] Xie C L, Zhuang X X, Niu Z M, *et al.* Amelioration of Alzheimer's disease pathology by mitophagy inducers identified via machine learning and a cross-species workflow [J]. *Nat Biomed Eng*, 2022, 6(1): 76-93.
- [35] Sharma D. Kaempferol in ameliorating diabetes-induced fibrosis and renal damage: An *in vitro* and *in vivo* study in diabetic nephropathy mice model [J]. *Phytomedicine*, 2020, 76: 153235.
- [36] Gupta S C, Kunnumakkara A B, Aggarwal S, *et al.* Inflammation, a double-edge sword for cancer and other age-related diseases [J]. *Front Immunol*, 2018, 9: 2160.

[责任编辑 潘明佳]