

# 基于转录组学和网络药理学探讨肉豆蔻挥发油干预低氧性肺动脉高压的作用机制

芦殿香<sup>1,2</sup>, 张虹波<sup>1#</sup>, 梁焯森<sup>1</sup>, 王玉蓉<sup>1</sup>, 于洋<sup>1</sup>, 李永芳<sup>1\*</sup>, 南星梅<sup>1\*</sup>

1. 青海大学 医学部, 青海 西宁 810001

2. 成都大学附属医院, 四川 成都 610081

**摘要:** **目的** 基于转录组学和网络药理学探讨肉豆蔻挥发油 (volatile oil from *Myristica fragrans*, VOMF) 干预低氧性肺动脉高压 (hypoxic pulmonary artery hypertension, HPAH) 的作用机制。**方法** 通过 SwissTargetPrediction 数据库获取 VOMF 活性成分和药物潜在靶点, 应用 GEO 数据库获取 HPAH 疾病相关靶点, Cytoscape 软件构建“成分-靶点-疾病”网络; 运用 Pymol 和 MOE 软件对 VOMF 关键活性成分与作用靶点进行分子对接。采用雄性 SD 大鼠制备肺动脉平滑肌细胞 (pulmonary artery smooth muscle cells, PASMCs), 低氧处理并给予 VOMF 干预后, 进行转录组学分析获取差异表达基因, 采用 Western blotting 验证 VOMF 对细胞周期信号通路相关蛋白表达的影响。**结果** 网络药理学分析共得到 VOMF 潜在作用靶点 512 个, HPAH 疾病相关差异靶点 2 912 个, 交集基因 80 个; 转录组学分析共得到 40 个共同差异表达基因。以  $P < 0.05$  为筛选条件将转录组学和京都基因与基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 通路富集分析结果进行交集, 得到交集通路 8 条, 其中与 HPAH 密切相关的包括细胞周期信号通路、丝裂原活化蛋白激酶信号通路、缺氧诱导因子-1 信号通路。结合文献报道和课题组前期研究, 选取细胞周期信号通路进行验证。Western blotting 结果显示, 与对照组比较, 模型组细胞周期蛋白依赖性激酶 2 (cyclin dependent kinase 2, CDK2)、CDK4、细胞周期蛋白 D1 (cell cycle protein D1, Cyclin D1)、Cyclin A2 蛋白表达水平升高 ( $P < 0.01$ 、 $0.001$ ), p27Kip1 蛋白表达水平降低 ( $P < 0.01$ ); 与模型组比较, VOMF 组 CDK2、CDK4、Cyclin D1、Cyclin A2 蛋白表达水平降低 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ 、 $0.001$ ), p27Kip1 蛋白表达水平升高 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ )。**结论** 从网络药理学和转录组学角度初步阐明了 VOMF 能够通过干预细胞周期信号通路, 进而干预 HPAH 的发生, 可为后续的药理学研究和临床应用提供依据与参考。

**关键词:** 肉豆蔻挥发油; 低氧肺动脉高压; 网络药理学; 转录组学; 7,9-二叔丁基-1-氧杂螺[4.5]癸-6,9-二烯-2,8-二酮; 异榄香脂素; 乙酸香叶酯; 细胞周期信号通路

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2024)10-3375-13

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.10.016

## Mechanism of volatile oil from *Myristica fragrans* on hypoxic pulmonary hypertension based on transcriptome and network pharmacology

LU Dianxiang<sup>1, 2</sup>, ZHANG Hongbo<sup>1</sup>, LIANG Zhuosen<sup>1</sup>, WANG Yurong<sup>1</sup>, YU Yang<sup>1</sup>, LI Yongfang<sup>1</sup>, NAN Xingmei<sup>1</sup>

1. Medical College of Qinghai University, Xining 810001, China

2. Affiliated Hospital of Chengdu University, Chengdu 610081, China

**Abstract: Objective** To explore the mechanism of volatile oil of *Myristica fragrans* (VOMF) on hypoxic pulmonary artery hypertension (HPAH) based on transcriptomics and network pharmacology. **Methods** Active components and potential drug targets of VOMF were obtained through SwissTargetPrediction database, HPAH disease related targets were obtained through GEO database,

收稿日期: 2023-12-16

基金项目: 青海省科技厅自然科学基金项目面上项目 (2021-ZJ-907); 国家自然科学基金资助项目 (32060088); 国家自然科学基金面上项目 (82374148); 国家自然科学基金资助项目 (82060786)

作者简介: 芦殿香, 博士, 教授, 博士生导师, 从事高原医学研究。E-mail: ludianxiang@126.com

#共同第一作者: 张虹波, 硕士研究生。E-mail: 17393270869@163.com

\*通信作者: 南星梅, 副教授, 硕士生导师, 主要从事高原医学、中藏药药理药效学研究。E-mail: wtyzchaha@163.com

李永芳, 教授, 硕士生导师, 主要从事中藏药药理学研究。E-mail: 345783110@qq.com

and “component-target-disease” network was constructed by Cytoscape software; Pymol and MOE software were used to verify the key active components and targets of VOMF by molecular docking. Male SD rats were used to prepare pulmonary artery smooth muscle cells (PASMCs), after given hypoxia treatment and VOMF intervention, transcriptomic analysis was performed to obtain differentially expressed genes, and Western blotting was used to verify the effect of VOMF on expressions of cell cycle signaling pathway related proteins. **Results** A total of 512 potential targets of VOMF, 2 912 differential targets related to HPAH disease and 80 intersection genes were obtained by network pharmacology analysis. A total of 40 common differentially expressed genes were obtained by transcriptome analysis. The results of transcriptomics and Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) pathway enrichment analysis were intersected with  $P < 0.05$  as the screening condition, and eight intersection pathways were obtained. Among them, the cell cycle signaling pathway, mitogen-activated protein kinase signaling pathway and hypoxia inducible factor-1 signaling pathway were closely related to HPAH. Based on literature research and previous research by the research group, cell cycle signaling pathway was selected for validation. The results of Western blotting experiments showed that compared with control group, cyclin dependent kinase 2 (CDK2), CDK4, cell cycle protein D1 (Cyclin D1), Cyclin A2 protein expression levels in model group were increased ( $P < 0.01, 0.001$ ), p27Kip1 protein expression level was decreased ( $P < 0.01$ ); Compared with model group, CDK2, CDK4, Cyclin D1, Cyclin A2 protein expression levels in VOMF group were decreased ( $P < 0.05, 0.01, 0.001$ ), p27Kip1 protein expression level was increased ( $P < 0.05, 0.01$ ). **Conclusion** From the perspectives of network pharmacology and transcriptomics, it has been preliminarily elucidated that VOMF can intervene in the occurrence of HPAH by intervening in the cell cycle signaling pathway, providing a basis and reference for subsequent pharmacological research and clinical applications.

**Key words:** volatile oil of *Myristica fragrans* Houtt.; hypoxic pulmonary artery hypertension; network pharmacology; transcriptomics; 7,9-ditert-butyl-1-oxaspiro[4.5]deca-6,9-diene-2,8-dione; isolemicin; geranyl acetate; cell cycle signaling pathway

低氧性肺动脉高压 (hypoxic pulmonary artery hypertension, HPAH) 是一种常见的肺血管疾病。该病的主要特征是低氧环境下肺血管收缩, 持续低氧则导致肺动脉结构重塑, 表现为肺动脉壁增厚, 肺动脉血流阻力增加, 引发右心负荷加重, 严重时可为右心衰竭, 甚至死亡<sup>[1]</sup>。HPAH 多发于慢性阻塞性肺病、间质性肺病、睡眠呼吸暂停患者和长期暴露于高海拔地区的人群中<sup>[2]</sup>。HPAH 的发生发展过程中, 最关键的病理学变化是肺动脉血管的收缩和重构<sup>[3]</sup>。肺动脉血管中膜的主要成分为肺动脉平滑肌细胞 (pulmonary artery smooth muscle cells, PASMCs), 持续的血管张力和血压引起 PASMCs 增殖和肥大, 是导致肺动脉高压发生发展的关键因素, 严重可引起右心衰竭和死亡<sup>[4]</sup>。因此研究 PASMCs 增殖作用, 探讨影响其增殖的调控通路是研究肺动脉高压治疗靶点的新方向。细胞周期信号通路是与细胞增殖周期相关的信号转导相关通路, 为磷脂酰肌醇 3-激酶 (phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K) / 蛋白激酶 B (protein kinase B, Akt)、丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK)、p53 等通路的下游<sup>[4-5]</sup>。研究表明, 下调细胞周期信号通路的相关蛋白, 能够抑制 PASMCs 增殖和促进细胞凋亡, 从而减轻肺血管重构和管壁增厚, 缓解肺动脉高压症状<sup>[6-8]</sup>。

肉豆蔻为肉豆蔻科植物肉豆蔻 *Myristica*

*fragrans* Houtt. 的干燥种仁, 广泛用于治疗腹泻、呕吐、宿食不消等症状, 并具有抗炎、抗菌、抗氧化、镇痛、防癌、驱虫、降血糖和保肝等作用<sup>[9]</sup>。肉豆蔻的活性成分主要包括挥发油和木脂素类化合物<sup>[10]</sup>, 然而这些成分在干预低氧性肺动脉高压过程中的作用和机制尚不明确。本课题组前期研究发现肉豆蔻挥发油 (volatile oil from *M. fragrans*, VOMF) 在高海拔低氧低压环境下具有抑制 PASMCs 增殖的作用, 其主要作用机制可能与上调 p27Kip1 蛋白表达, 从而抑制细胞周期蛋白 D1 (cell cycle protein D1, Cyclin D1) 与细胞周期蛋白依赖性激酶 4 (cyclin dependent kinase 4, CDK4) 结合产物有关<sup>[11]</sup>。为进一步探究 VOMF 治疗 HPAH 可能存在的途径和靶点, 本研究采用网络药理学和转录组学分析技术, 探讨 VOMF 干预 HPAH 的作用机制, 并结合 Western blotting 实验对转录组学和网络药理学结果进行验证, 为 VOMF 的临床应用提供参考依据。

## 1 材料

### 1.1 动物

SPF 级雄性 SD 大鼠 8 只, 体质量 (100±10) g, 购自北京华阜康生物科技股份有限公司, 动物生产许可证号 SCXK (京) 2019-0010。动物饲养于温度 (22±2) °C、相对湿度 40%~60% 的环境中, 适应性饲养 7 d, 自由进食饮水。动物实验经青海大学伦理委员会批准 (批准号 2017081501)。

## 1.2 药材

肉豆蔻购自青海中藏药市场,经青海大学张得钧教授鉴定为肉豆蔻科植物肉豆蔻 *M. fragrans* Houtt.的干燥种仁。VOMF的提取方法、主要化学成分及含量见课题组前期研究结果<sup>[1]</sup>。VOMF主要分为单萜类和芳香族类化合物。利用GC-MS分析,共鉴定得到75个化合物。萜类化合物47种,占总挥发油的61.21%,其中单萜类30种(54.14%)、倍半萜类17种(7.07%);脂肪族化合物14种,占总挥发油的6.74%,其中烷烃类2种(0.05%)、羧酸类3种(6.08%)、醇类3种(0.23%)、酯类4种(0.30%)、酮类2种(0.08%);芳香族化合物14种,占总挥发油的32.52%,其中醚类5种(27.73%)、酚类8种(4.53%)、烃类1种(0.26%)。

## 1.3 药品与试剂

胎牛血清(批号2302008)购自上海达特希尔生物科技有限公司;双抗(批号SV30010)、二甲亚砜(批号710N0317)、TritonX-100(批号304L024)购自北京索莱宝科技有限公司;DMEM高糖基础培养基(批号WH0022U061)、无菌PBS缓冲液(批号WH0022E091)、0.25%胰蛋白酶溶液(批号WH0221K271)购自武汉普诺赛生命科技有限公司;西地那非(批号139755-83-2)购自上海源叶生物科技有限公司;DAB染色试剂盒(批号17E10A27)、4%多聚甲醛(批号0810A22)、 $\alpha$ -SMA抗体(批号BST17323902)、CDK2抗体(批号M00166-3)、CDK4抗体(批号PB9535)、CyclinD1抗体(批号BM4272)、CyclinA2抗体(批号PB9424)、p27Kip1抗体(批号A0290)、缺氧诱导因子-1 $\alpha$ (hypoxia inducible factor-1 $\alpha$ , HIF-1 $\alpha$ )抗体(批号PB9253)购自武汉博士德生物工程有限公司; $\beta$ -actin抗体(批号AB0035)、山羊抗兔/鼠IgG二抗(批号AB0101)购自安必维技术有限公司。

## 1.4 仪器

51119770DP型全自动酶标仪、L550型高速冷冻离心机(美国Thermo Fisher Scientific公司);电热恒温水浴箱(北京市六一仪器厂);HF212(HT)型常氧培养箱、HF100(Tri-Gas)型三气培养箱(上海力康公司);DMi1型倒置光学显微镜(上海莱卡显微系统有限公司);微孔板孵育振荡器(江苏其林贝尔仪器制造有限公司);SW-CJ-1F型超净工作台(苏州安泰空气技术有限公司);L550型离心机(湘仪实验室仪器开发有限公司);Amersham Imager

600型显影仪(美国GE公司);GWB-2T型超纯水机(普析通用仪器有限责任公司)。

## 2 方法

### 2.1 网络药理学分析

**2.1.1 VOMF活性成分及对应靶点的筛选** 课题组前期通过GC-MS分析,共鉴定出VOMF中的75个化合物<sup>[1]</sup>,通过PubChem数据库(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)得到各成分的SMILES号,输入SwissTargetPrediction网站(<http://www.swisstargetprediction.ch/>)进行各成分的靶点预测,筛选可能性大于0筛选靶点,整理去重得VOMF成分靶点库。

**2.1.2 肺动脉高压疾病靶点数据库的构建** 以“pulmonary artery hypertension, PAH”为关键词在GEO数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>)进行检索,来源选择“Homo sapiens”,系列类型选择“Expression profiling by array”,获取符合条件的数据集以构建肺动脉高压疾病靶点数据库。随后,使用R3.6.0(<https://www.r-project.org/>)中GEO query程序包对基因芯片数据进行下载,提取表达矩阵,对原始数据进行log<sub>2</sub>转化,并对数据进行归一化处理提取临床信息。使用limma程序包对两组进行差异基因分析,界定条件为|log<sub>2</sub>差异倍数(fold change, FC)|>0.585且校正后P<0.05,绘制火山图和热图。

**2.1.3 活性成分和疾病共同靶点的筛选** 通过Venny网站(<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>)对VOMF的活性成分和肺动脉高压的靶点取交集,得到活性成分和疾病的交集靶点。

**2.1.4 交集基因蛋白质-蛋白质相互作用(protein-protein interaction, PPI)网络构建和富集分析** 将上述筛选的核心基因导入String数据库(<https://cn.string-db.org/>),以“minimum required interaction score $\geq$ 0.4”为筛选条件,构建PPI网络,下载并保存PPI网络和tsv格式文件。为了进一步探究交集基因的生物学功能,使用R软件中的“clusterProfiler”“org.Hs.eg.db”和“ggplot2”包对核心基因进行基因本体(gene ontology, GO)功能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,探究VOMF潜在靶点的主要分子生物过程和信号通路,并进行可视化。

**2.1.5 核心基因筛选及VOMF活性成分-靶点-疾病网络的构建** 为了进一步了解VOMF治疗肺动脉

高压的潜在基因,对交集基因进行筛选分析核心基因。将核心基因导入 string 数据库后,保留 tsv 格式文件,将其导入 Cytoscape 软件。利用 cytohubba 插件进行核心基因的筛选。最后采用 Cytoscape 3.9.0 软件将结果进行可视化,构建“成分-靶点-疾病”网络图,通过其软件自带插件对网络展开分析,筛选其中度值较高的成分和靶点开展分子对接研究。

## 2.2 分子对接验证

将核心成分导入 Chem3D 软件中,构建其化学结构式并对其进行能量最小化处理,保存为 pdb 格式文件,将关键靶点带入 PDB 数据库中,下载对应蛋白为 pdb 格式文件,将其导入 pymol 软件中进行去除水分子,去除小分子,将蛋白导入 autodocktool 软件中进行加氢处理,并保存为 pdbqt 格式文件。利用 pymol 和 MOE 软件采用全原子对接方法进行分子对接和可视化分析。

## 2.3 体外实验验证

**2.3.1 PASCs 的提取和培养** 将 8~10 周龄的 SD 大鼠脱颈处死,75%乙醇浸泡 5~10 min,无菌快速分离大鼠肺组织,在无菌操作台上将肺组织放入培养皿中以 PBS 浸泡,置于冰上。分离肺组织 2~3 级肺血管,将肺小动脉血管剪开轻微刮除内层和外层后,置于含 15%胎牛血清-DMEM 培养基的培养皿中,用眼科剪将 2~3 级肺血管剪成 1~2 mm 的组织块,转移到 T25 培养瓶中<sup>[12]</sup>。将 T25 培养瓶置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 恒温细胞培养箱中孵育,期间不进行移动,贴壁 3~7 d,显微镜下观察组织块周围是否有细胞爬出,待细胞密度达约 70%时,用 0.25% 胰酶消化并传代。用含 15%胎牛血清的 DMEM 培养基培养大鼠原代 PASCs 并传代。

取 3 代细胞进行  $\alpha$ -SMA 免疫组化实验,在 6 孔板中的玻片上以  $2.5 \times 10^5$  个/孔接种,常氧培养至细胞融合度达 50%时,每孔加入 200  $\mu$ L 预冷的 4%多聚甲醛,室温固定 20 min, PBS 清洗,加入 200  $\mu$ L 0.3% TritonX-100, 10 min 后加入 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>,清洗后加入 5%牛血清白蛋白,37 °C 封闭 30 min,以 1:500 比例加入 PBS (阴性对照)和  $\alpha$ -SMA (阳性对照),4 °C 孵育过夜,加入二抗,37 °C 孵育 30 min,玻片上滴加 DAB 工作液,中性树胶封片后显微镜下观察阳性信号。

**2.3.2 PASCs 的 RNA 提取、转录组学测序与数据分析** 取 3 代 PASCs 用培养基稀释后,以  $3 \times 10^5$  个/孔接种到 6 孔板中,培养 24 h 至贴壁后,

去除培养液,加入无血清的培养基同步化处理细胞 8 h,设置对照组、模型组及 VOMF 低、中、高剂量 (0.8、1.6、3.2 g/L) 组和西地那非 (1.0 g/L) 组,每组设置 3 个复孔,对照组常氧处理 (5% CO<sub>2</sub>+95% 空气),其余各组低氧处理 (3% O<sub>2</sub>+5% CO<sub>2</sub>+92% N<sub>2</sub>),各给药组给予药物培养 24 h<sup>[13-14]</sup>。按照 RNA 提取试剂盒说明书对每组细胞进行 RNA 提取,每组 3 个复孔合并为 1 个样本。Ovation RNA-Seq System 扩增 cDNA,SPRI works Fragment Library System II 构建 cDNA 文库,将提取的 RNA 溶液委托北京诺禾致源生物信息科技有限公司进行转录组学测序。以  $|\log_2FC| > 1$ 、 $P < 0.05$  为条件筛选对照组 vs 模型组和模型组 vs VOMF 组的差异表达基因 (differentially expressed genes, DEGs),其中 FC 表示 2 个样品间表达量的比值,进一步取交集得到转录组学测序的 DEGs。

**2.3.3 Western blotting 检测 CDK2、CDK4、Cyclin D1、Cyclin A2、p27Kip1 蛋白表达** 按“2.3.2”项下方法进行分组和给药,培养 12 h,弃去培养液,用预冷 PBS 清洗 3 次。每孔加入细胞裂解液 100  $\mu$ L,冰上裂解 30 min,4 °C、12 000 r/min 离心 5 min。取上清液,BCA 试剂盒测定蛋白浓度,加入上样缓冲液后煮沸 5~10 min 使蛋白变性。蛋白样品经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳,转至 PVDF 膜,加入 5%脱脂牛奶于室温封闭 1 h 后,分别加入兔抗  $\beta$ -actin (1:10 000)、CDK2 (1:1 000)、CDK4 (1:1 000)、Cyclin D1 (1:1 000)、Cyclin A2 (1:1 000)、p27Kip1 (1:1 000) 单克隆抗体,4 °C 摇床孵育过夜;加入 HRP 标记的山羊抗兔 IgG 抗体 (1:10 000),室温孵育 1 h, TBST 洗涤 3 次,每次 10 min,加入 ECL 化学发光液曝光显色,采用 Image J 软件分析条带灰度值。

**2.3.4 统计学分析** 数据采用  $\bar{x} \pm s$  表示,采用 SPSS 13.0 软件进行统计学分析。 $t$  检验进行两组间比较,单因素方差分析进行多组间比较。

## 3 结果

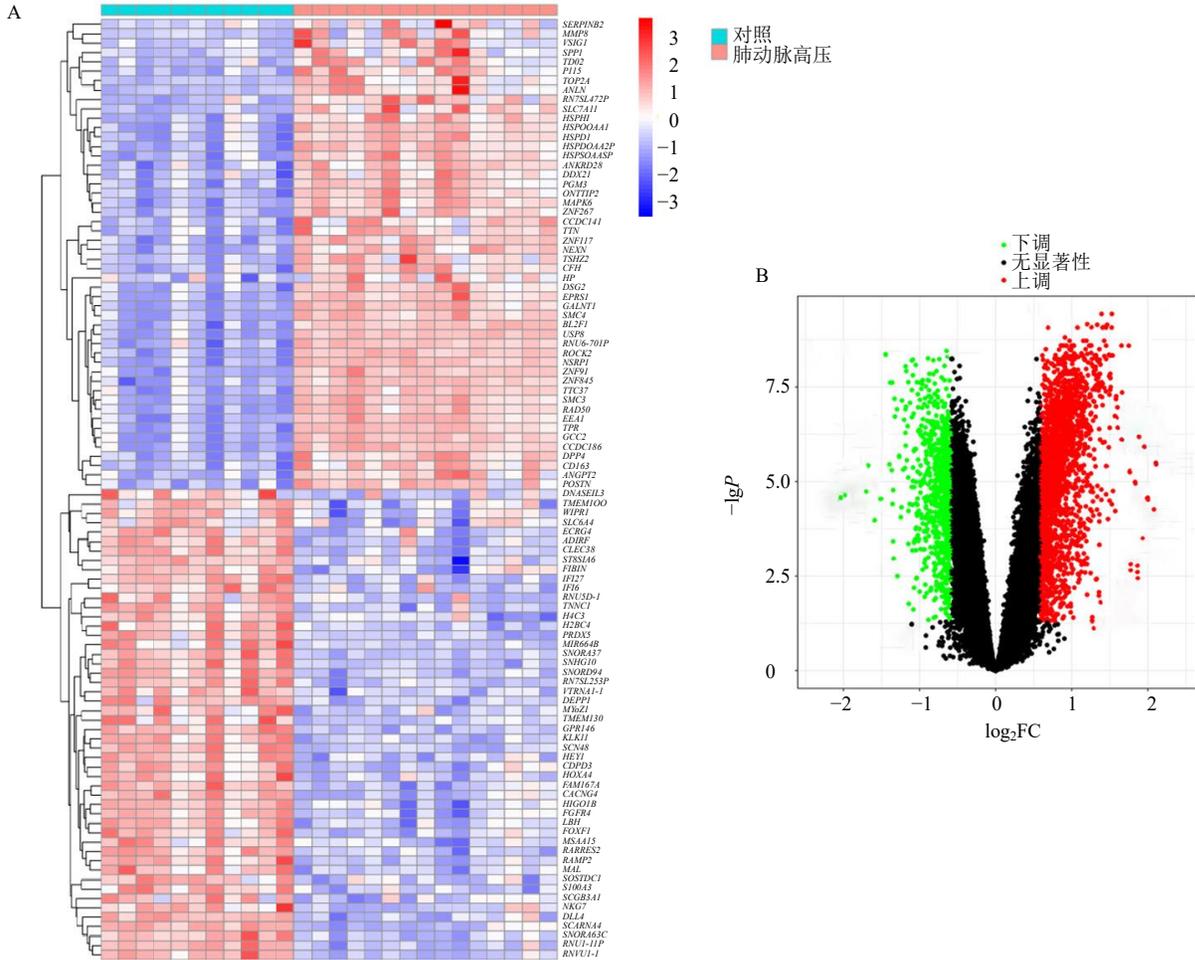
### 3.1 网络药理学分析

**3.1.1 VOMF 活性成分靶点、疾病靶点以及交集靶点的筛选** 使用 PubChem 数据库获取 VOMF 活性成分相关 SMILES 号。随后,将 SMILES 号输入 SwissTargetPrediction 网站,进行成分的作用靶点预测,根据预测得分选取每个成分的靶点纳入成分靶点库中,同时删去预测得分为 0 的靶点并保留预测

得分大于 0 的靶点进行汇总去重，最终整理得到 VOMF 活性成分相关靶点 512 个。

通过 GEO 数据库对肺动脉高压相关疾病靶点进行检索，作为发现的训练数据集，GSE113439 数据集由 GPL6244 [HuGene-1\_0-st] Affymetrix Human Gene 1.0 ST Array [transcript (gene) version]平台构

建，包含 15 名肺动脉高压患者肺部组织样本和 11 名健康对照肺部组织样本，研究中使用的所有数据均由 GEO 获得。差异分析结果显示，共获得 2 912 个差异基因，包括 2 076 个上调的基因和 836 个下调的基因（图 1）。将 VOMF 成分靶点与肺动脉高压靶点进行交集，得到二者共同靶点 80 个（图 2）。



A-差异基因聚类热图；B-差异基因火山图。

A-clustering heatmap of differential gene; B-volcano map of differential gene.

图 1 肺动脉高压患者差异基因分析

Fig. 1 Differential gene analysis of patients with pulmonary artery hypertension

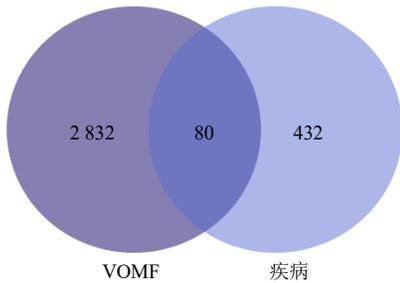


图 2 VOMF 成分靶点与疾病靶点交集图

Fig. 2 Intersection diagram of VOMF component targets and disease targets

**3.1.2 成分-靶点-疾病网络的构建** 将活性成分和疾病靶点筛选得到的交集靶点导入到 Cytoscape 3.9.0 软件中，构建成分-交集靶点疾病网络（图 3），活性成分、靶点以及疾病均以节点表示，相互关系则以边表示。随后，对疾病网络进行拓扑学分析，以度值反映节点的重要程度，度值越大则表示其在该网络中越重要。筛选出度值排名前 10 的主要活性成分为 7,9-二叔丁基-1-氧杂螺[4.5]癸-6,9-二烯-2,8-二酮、异榄香脂素、乙酸香叶酯、肉豆蔻醚、榄香素、甲基异丁香酚、没药醇、邻苯二甲酸二丁酯、

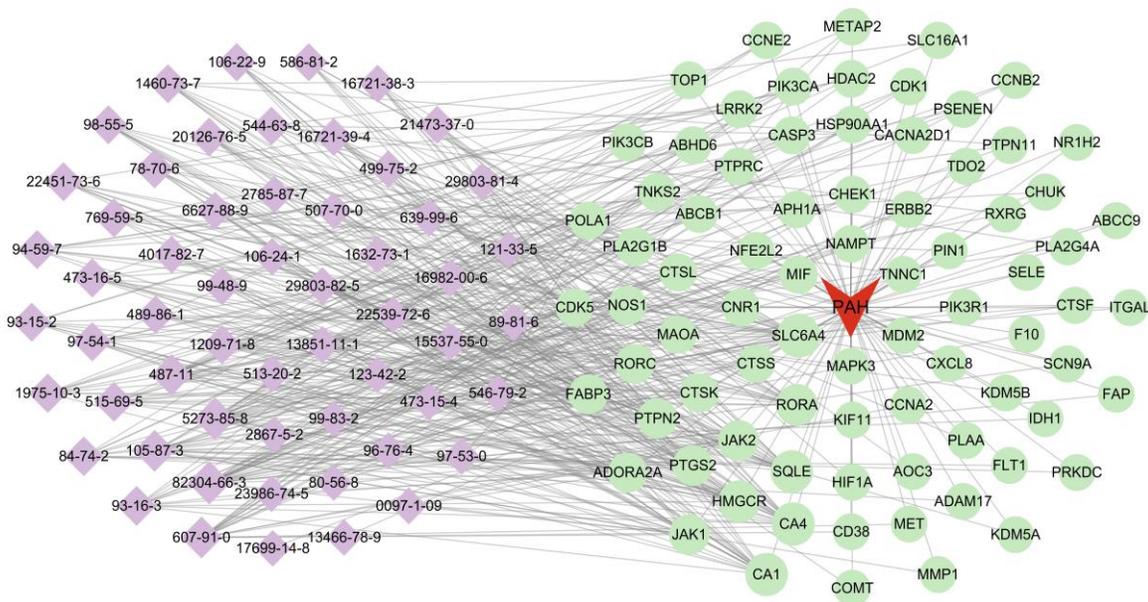


图3 药物-成分-靶点网络

Fig. 3 Drug-component-target network

异丁香酚、 $\alpha$ -桉叶油醇。

**3.1.3 交集靶点 PPI 网络构建和核心靶点筛选** 将上述 80 个交集靶点导入 String 数据库中, 获取核心基因间相互作用关系图 (图 4)。为了进一步明确交集靶点在治疗肺动脉高压中的潜在机制, 对交集靶点进行拓扑分析筛选核心靶点。通过 Cytoscape 软件中的 cytohubba 插件对 80 个交集靶点进行拓扑分析, 根据其最大集团中心度、中介中心度、接近中心度、度值得分进行排序, 最后将 4 种算法得到的

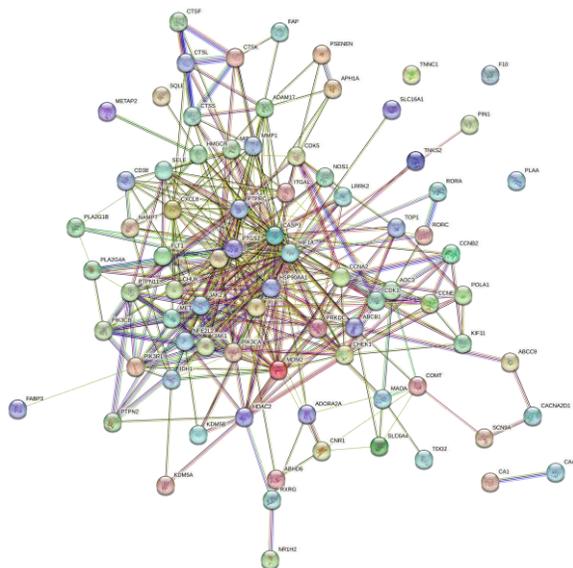


图4 PPI网络

Fig. 4 PPI network

前 10 位靶点进行交集, 共获得 5 个核心靶点, 分别是半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3 (cystein-aspartate protease-3, CASP3)、HIF1A、热休克蛋白 90 $\alpha$  家族 A 类成员 1 (heat shock protein 90 $\alpha$  family class A member 1 gene, HSP90AA1)、Erb-b2 受体酪氨酸激酶 2 (Erb-b2 receptor tyrosine kinase 2 gene, ERBB2)、前列腺素内过氧化物合酶 2 (prostaglandin-endoperoxide synthase 2, PTGS2)。

**3.1.4 富集分析** 通过 R 语言软件的“cluster profiler”包对 VOMF 治疗肺动脉高压的 80 个核心基因进行 GO 功能富集分析, 结果得到 GO 条目共 1651 条 ( $P < 0.05$ ), 主要类别为生物学进程 (biological process, BP)、细胞组分 (cellular component, CC)、分子功能 (molecular function, MF)。其中 BP 条目 1441 个, 主要涉及对药物的应答反应、对抗生素的应答反应、对脂多糖的应答、对细菌来源的分子的反应、节律程序等; CC 条目 79 个, 主要涉及转移酶复合体、转移含磷基团、膜筏、质膜微区、膜区、小腔等; MF 条目 131 个, 主要涉及胰岛素受体底物结合、支架蛋白结合、蛋白聚糖结合、内肽酶活性、组蛋白激酶活性等 (图 5)。表明 VOMF 可能通过作用于这些细胞结构, 影响这些生物进程, 发挥这些分子功能来达到治疗肺动脉高压的目的。

通过 R 语言软件的“cluster profiler”包对 VOMF 治疗肺动脉高压的 80 个交集靶点进行 KEGG 通路

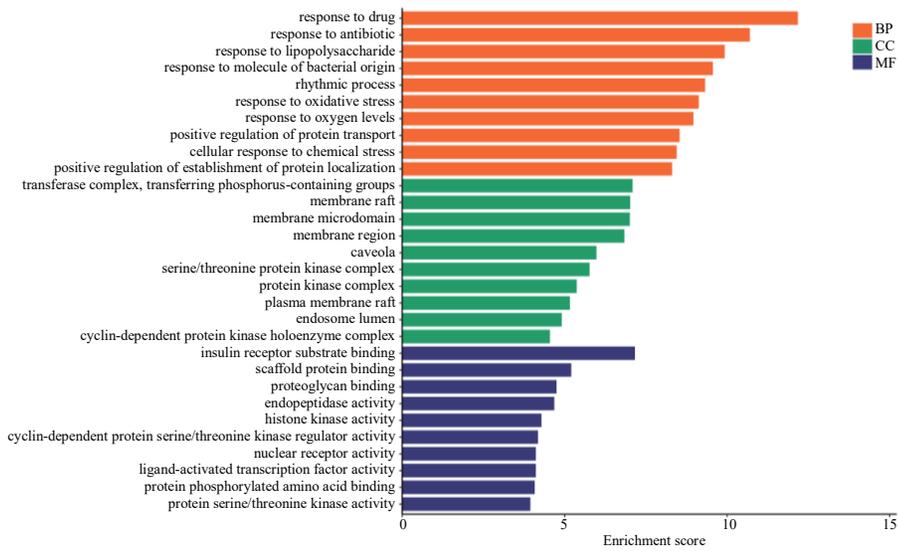


图5 GO 富集分析

Fig. 5 GO enrichment analysis

富集分析, 结果得到 VOMF 干预肺动脉高压的信号通路共 140 条 ( $P < 0.05$ ), 主要涉及癌症中细胞程序性死亡配体 1 (programmed cell death ligand 1, PD-L1) 表达和细胞程序性死亡受体 1 (programmed cell death protein 1, PD-1) 检查点通路、C 型凝集素受体信号通路、肿瘤坏死因子信号通路、甲状腺激素信号通路、PI3K-Akt 信号通路, 将富集结果可视化, 见图 6。

### 3.2 分子对接

选取 5 个核心靶点 CASP3、HIF1A、HSP90AA1、ERBB2、PTGS2 与前 3 个核心化合物 7,9-二叔丁基-1-氧杂螺[4.5]癸-6,9-二烯-2,8-二酮、异榄香脂素、乙

酸香叶酯进行分子对接, 分子对接结合能热图见图 7, 分子对接模式见图 8。乙酸香叶酯与 PTGS2 的结合能为  $-25.8537 \text{ kJ/mol}$ , 具有较好的相互作用力, 主要与 LYS B:137 形成氢键关联。7,9-二叔丁基-1-氧杂螺[4.5]癸-6,9-二烯-2,8-二酮与 HSP90AA1 结合能为  $-25.2714 \text{ kJ/mol}$ , 具有良好的结合作用, 主要与 LYS A:58、ASN A:51 形成氢键作用。乙酸香叶酯与 HSP90AA1 的结合能为  $-25.0169 \text{ kJ/mol}$ , 具有良好的结合作用。7,9-二叔丁基-1-氧杂螺[4.5]癸-6,9-二烯-2,8-二酮与 CASP3 的结合能为  $-24.4367 \text{ kJ/mol}$ , 具有良好的结合作用, 主要形成氢键 (GLN A:161) 和疏水键作用力。

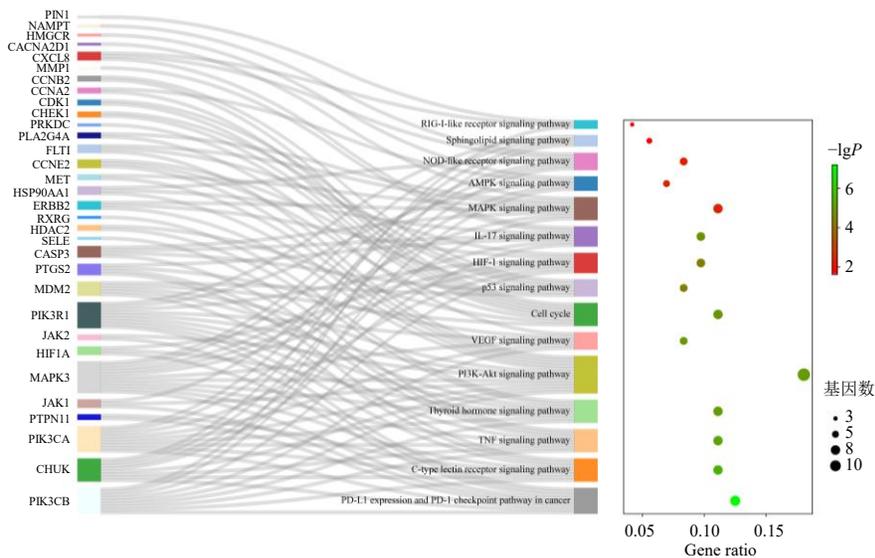


图6 KEGG 通路富集分析

Fig. 6 KEGG pathway enrichment analysis

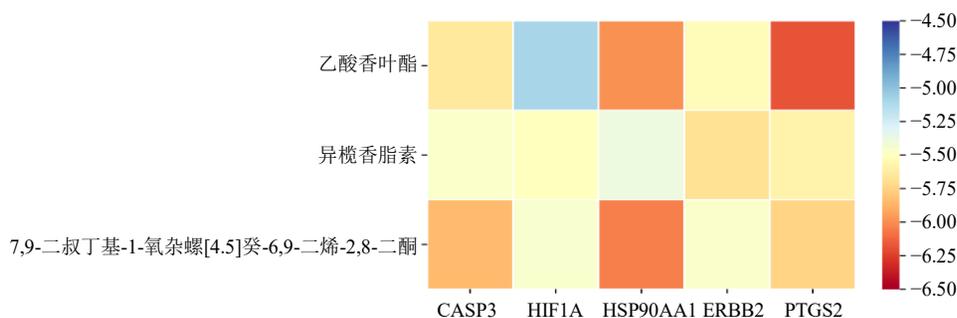
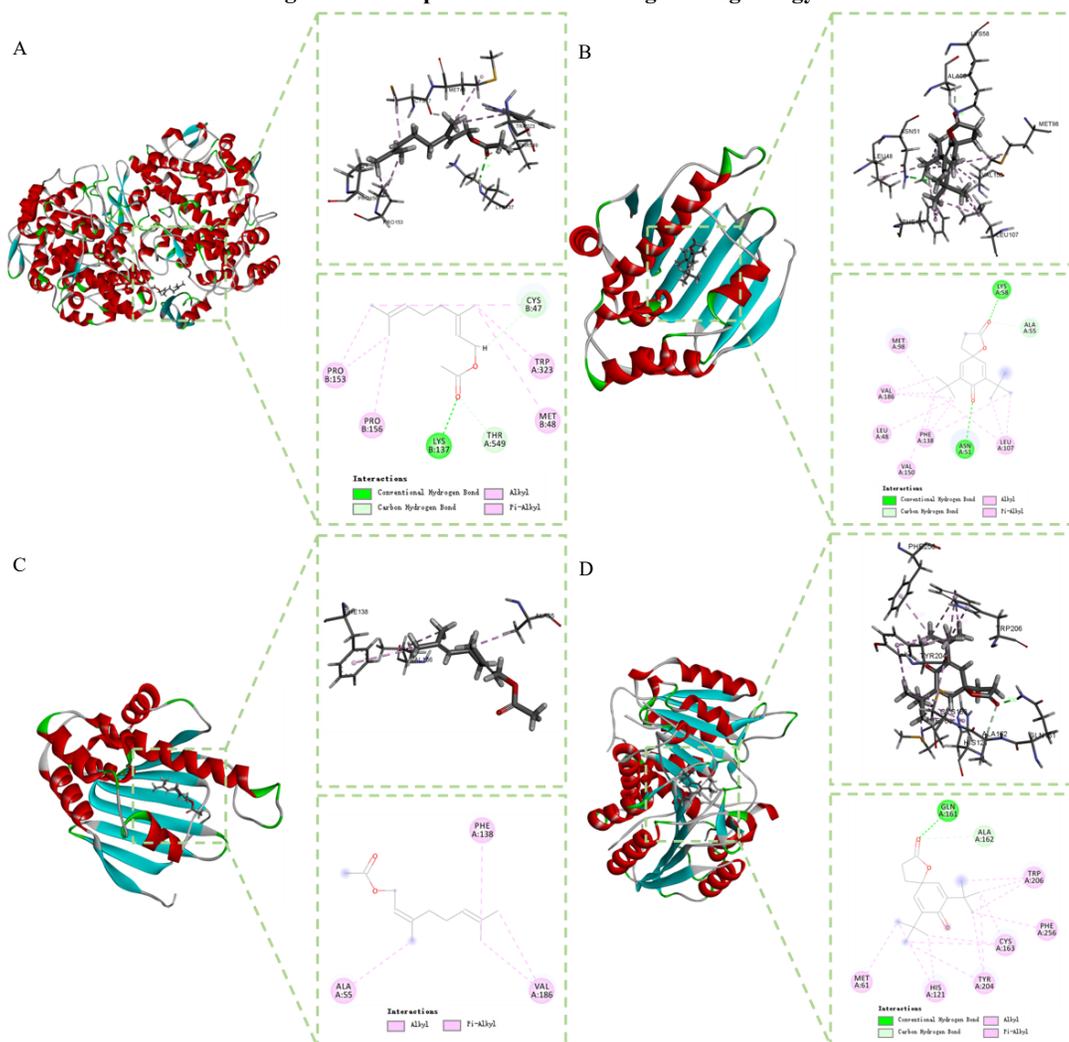


图 7 分子对接结合能热图

Fig. 7 Heatmap of molecular docking binding energy



A-乙酸香叶酯与 PTGS2 对接结果; B-7,9-二叔丁基-1-氧杂螺[4.5]癸-6,9-二烯-2,8-二酮与 HSP90AA1 对接结果; C-乙酸香叶酯与 HSP90AA1 对接结果; D-7,9-二叔丁基-1-氧杂螺[4.5]癸-6,9-二烯-2,8-二酮与 CASP3 对接结果。

A-docking results of geranyl acetate with PTGS2; B-docking results of 7,9-di-tert-butyl-1-oxaspiro [4.5] deca-6,9-diene-2,8-dione with HSP90AA1; C-docking results of geranyl acetate with HSP90AA1; D-docking results of 7,9-di-tert-butyl-1-oxaspiro [4.5] deca-6,9-diene-2,8-dione with CASP3.

图 8 分子对接图

Fig. 8 Molecular docking diagram

### 3.3 体外验证实验

3.3.1 PSMCs 验证 利用  $\alpha$ -SMA 免疫组化法鉴别从 SD 大鼠肺中分离出的 3 代肺血管平滑肌细胞

(图 9)。染色结果呈棕黄色为阳性表达,且阳性信号超过 98%。故细胞具有正常的  $\alpha$ -SMA 阳性表达,所得细胞为典型的 PSMCs,可用于下一步实验。

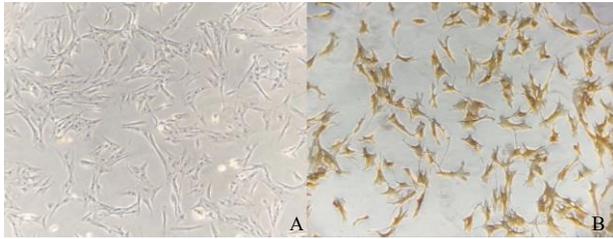
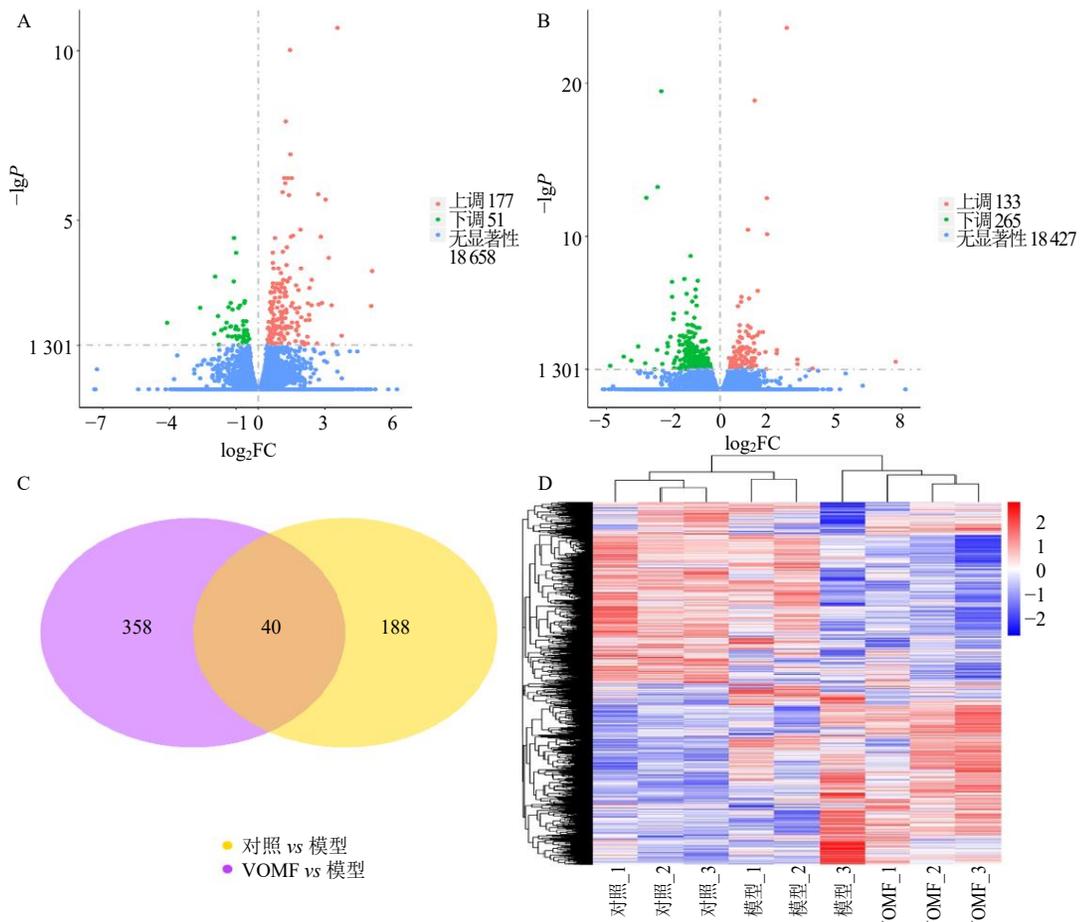


图9 PASCs形态(A)和 $\alpha$ -SMA染色图(B)( $\times 10$ )  
Fig. 9 Morphology (A) and  $\alpha$ -SMA staining (B) of PASCs ( $\times 10$ )



A-对照组 vs 模型组的 DEGs 火山图; B-VOMF 组 vs 模型组的 DEGs 火山图; C-对照组 vs 模型组、VOMF 组 vs 模型组的 DEGs 交集韦恩图; D-对照组、模型组、VOMF 组的 DEGs 聚类热图。

A-volcano map of DEGs in control group vs model group; B-volcano map of DEGs in VOMF group vs model group; C-Venn plot of intersection of DEGs in control group vs model group, VOMF group vs model group; D-cluster heatmaps of DEGs in control group, model group and VOMF group.

图10 DEGs 统计分析

Fig. 10 Statistical analysis of DEGs

**3.3.3 GO 功能和 KEGG 通路富集分析** 以  $P < 0.05$  为条件进行 GO 分析, 对照组 vs 模型组筛选得到 145 个条目, 其中大部分与能量代谢、糖酵解/异生相关, 如二磷酸腺苷 (adenosine diphosphate, ADP) 能量代谢、嘌呤核苷二磷酸代谢过程、糖酵解过程等 BP; VOMF 组 vs 模型组筛选得到 176 个

**3.3.2 DEGs 的筛选** 以  $|\log_2FC| > 1$ 、 $P < 0.05$  为条件筛选 DEGs, 如图 10 所示, 对照组 vs 模型组筛选后共得到 228 个 DEGs, 其中 177 个基因上调, 51 个基因下调。VOMF 组 vs 模型组筛选后共得到 398 个 DEGs, 其中 133 个基因上调 265 个基因下调。将对照组 vs 模型组筛选到的 228 个 DEGs 和 VOMF 组 vs 模型组筛选得到的 398 个 DEGs 进一步取交集, 得到 40 个共同 DEGs。对 40 个共同 DEGs 进行聚类分析发现 VOMF 组与对照组基因表达量相似度低。

条目, 其中大部分与染色体分离、核分裂、细胞分裂等 CC 相关。以  $P < 0.05$  为条件进行 KEGG 通路富集分析, 对照组 vs 模型组、VOMF 组 vs 模型组筛选分别得到 8 条显著性信号通路, 其中与 HPAH 密切相关的信号通路为细胞周期、HIF-1 信号通路、MAPK 信号通路, 见图 11。

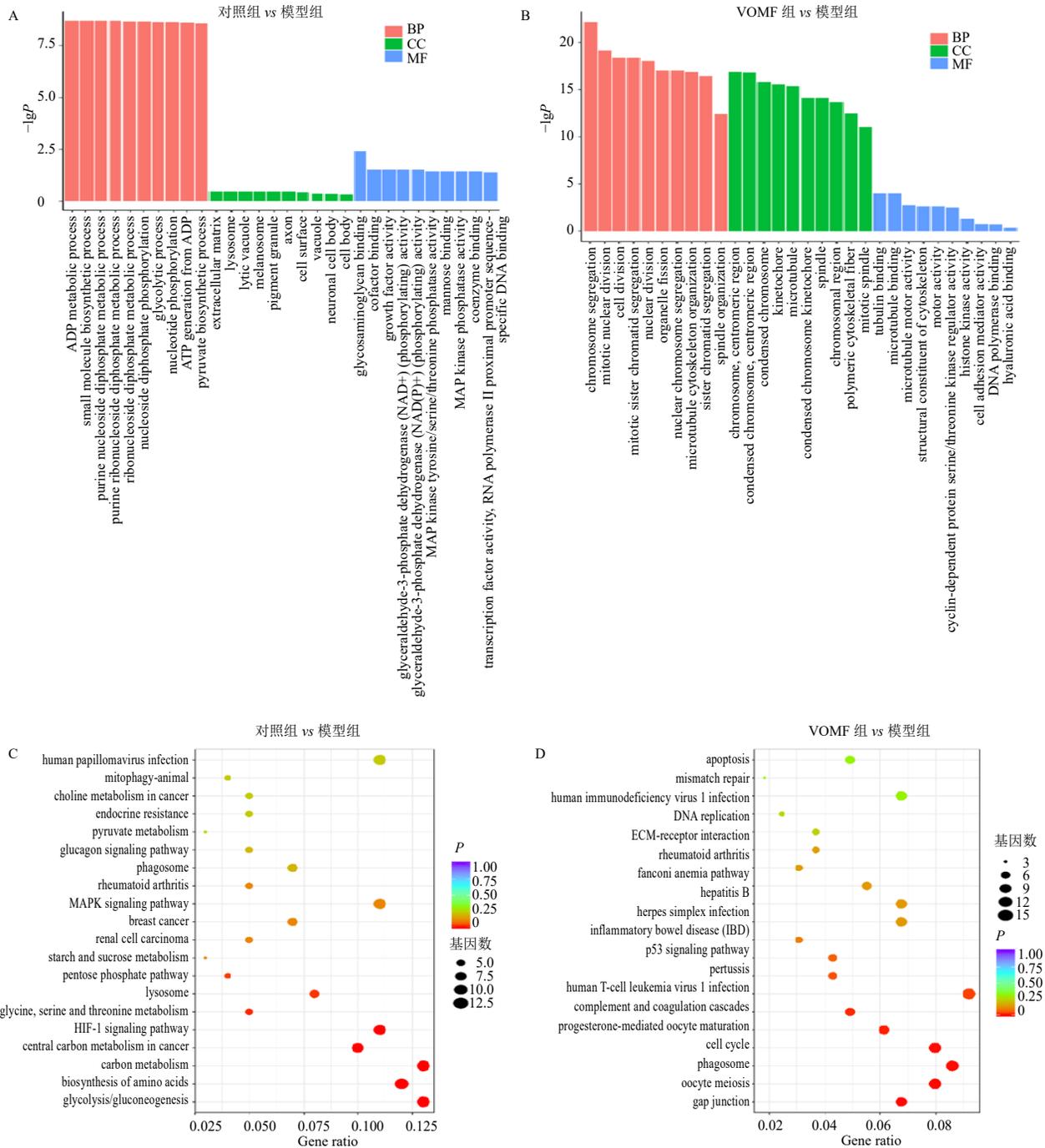


图 11 GO 功能 (A、B) 和 KEGG 通路富集分析 (C、D)  
 Fig. 11 GO function (A, B) and KEGG pathway enrichment analysis (C, D)

**3.3.4** VOMF 对低氧诱导的 PASCs 中 Cyclin D1、CDK4、p27Kip1、Cyclin A2、CDK2、HIF-1 $\alpha$  蛋白表达的影响 如图 12 所示, 与对照组比较, 模型组 PASCs 中 Cyclin D1、CDK4、Cyclin A2、CDK2、HIF-1 $\alpha$  蛋白表达水平升高 ( $P < 0.01$ 、 $0.001$ ), p27Kip1 蛋白表达水平降低 ( $P < 0.01$ ); 与模型组比较, VOMF 各剂量组和西地那非组 PASCs 中 Cyclin A2 蛋白表达水平降低 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ 、

$0.001$ ), VOMF 中、高剂量组和西地那非组 CDK4、CDK2 蛋白表达水平降低 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ 、 $0.001$ ), VOMF 中剂量组 Cyclin D1 蛋白表达水平降低 ( $P < 0.01$ ), VOMF 低、中剂量组 p27Kip1 蛋白表达水平显著升高 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ ), 各给药组 HIF-1 $\alpha$  蛋白表达水平均无明显差异。表明 VOMF 能够通过调控细胞周期相关蛋白改善低氧诱导的 HPAH, 从而抑制 HPAH 的发生发展。

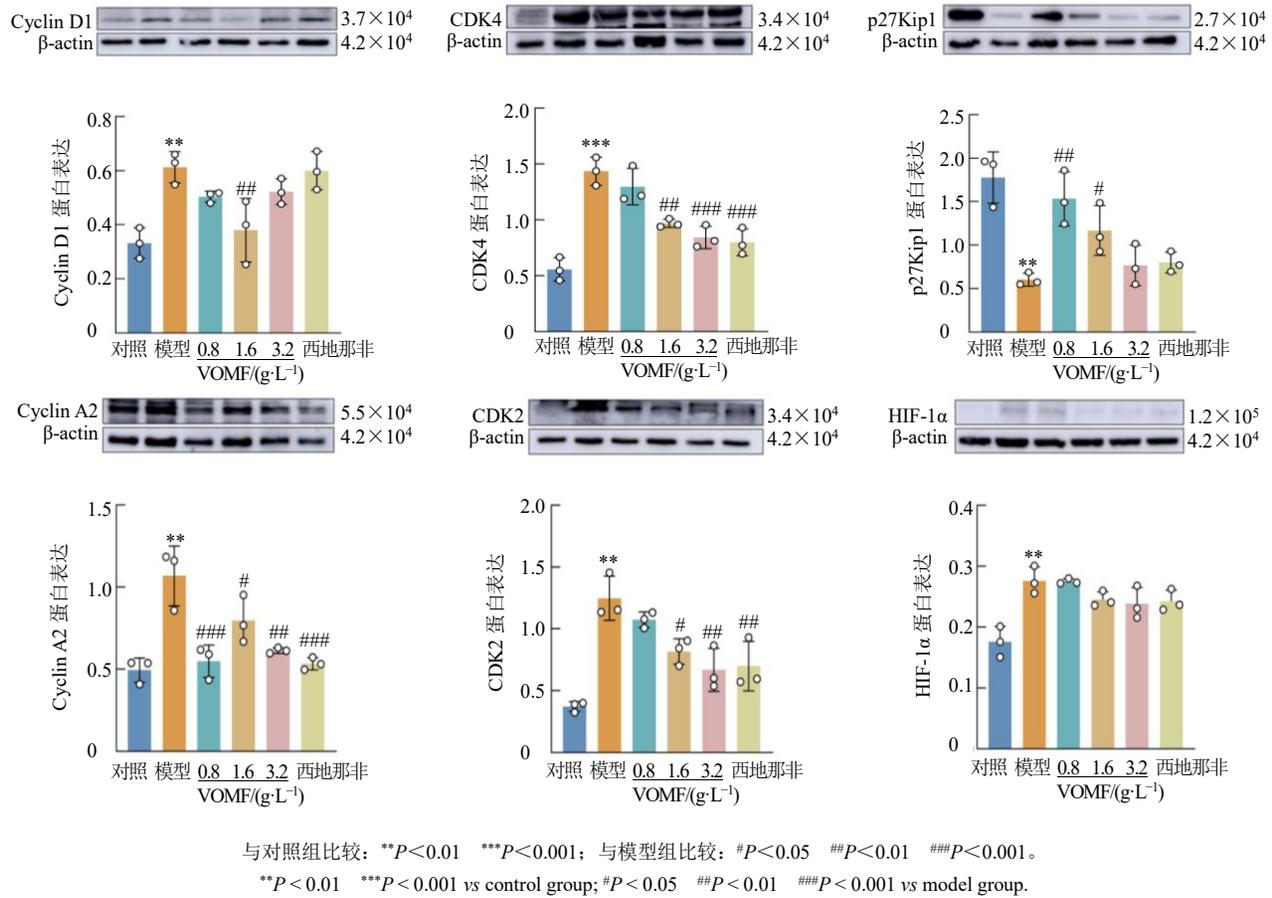


图 12 VOMF 对低氧诱导的 PASMCs 中 Cyclin D1、CDK4、p27Kip1、Cyclin A2、CDK2、HIF-1 $\alpha$  蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 12 Effect of VOMF on Cyclin D1, CDK4, p27Kip1, Cyclin A2, CDK2 and HIF-1 $\alpha$  protein expressions in hypoxia-induced PASMCs ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

#### 4 讨论

HPAH 是肺动脉高压常见的临床类型，是由于低氧刺激或对高原低氧环境不习服所导致的恶性进展性疾病，低氧性肺血管收缩和肺血管重构是 2 个关键的病理性变化，急性缺氧可致肺血管收缩，慢性缺氧可致肺血管重构<sup>[15]</sup>。当机体处于急性低氧时，肺阻力性血管快速收缩，保障血流在传导性血管中重新分布，血流向供氧更好的区域，保证全身供氧，而肺动脉压力不至于过度升高。随低氧时间延长或慢性低氧状态下，在血管持续收缩的基础上，肺血管增殖过程启动<sup>[16]</sup>。缺氧时平滑肌细胞中产生并释放大量生物活性物质，这一变化导致血管平滑肌细胞收缩、离子通道功能改变、胞内 Ca<sup>2+</sup>浓度升高及通道蛋白表达水平的变化，进而促进肺阻力血管收缩、肺动脉压力明显升高，PASMCs 增殖<sup>[17]</sup>。HPAH 通常伴有肺血管压力异常升高和右心衰竭等症状，其病因复杂，预后极差，其具体发病机制至

今仍不明确，目前暂无有效的临床手段针对 HPAH 予以治疗。当前 HPAH 的传统治疗方法有吸氧、利尿剂、钙离子拮抗剂等，现有的靶向药物主要通过内皮素途径、前列环素途径及一氧化氮途径发挥疗效，这些途径的靶向药物可扩张血管、降低血管阻力，改善 HPAH 症状，但不良反应众多且严重，价格昂贵等因素限制了临床使用<sup>[18]</sup>，因此急需探寻新的靶向药物治疗 HPAH。

VOMF 是从肉豆蔻中提取的主要活性成分之一，在防病治病应用领域受到越来越多的关注。主要的研究集中在抗菌、抗氧化、抗炎、抗肿瘤的药理作用方面<sup>[19]</sup>。本课题组前期通过考察不同浓度的 VOMF 对低氧刺激下 PASMCs 增殖的抑制作用<sup>[11]</sup>，发现 VOMF 抑制低氧诱导的 PASMCs 增殖活性强于常氧组，且具有浓度相关性，主要的机制可能与 Cyclin D1、CDK4 等细胞周期相关蛋白的调控有关，表明 VOMF 能抑制血管中 PASMCs 增殖，从而降

低肺血管阻力,舒张血管,延缓 PAH 的发生发展。

本研究通过 RNA-seq 测序技术将对照组 vs 模型组筛选到的 228 个 DEGs 和 VOMF 组 vs 模型组筛选得到的 398 个 DEGs 进一步取交集,得到 40 个共同 DEGs。对 40 个共同 DEGs 进行聚类分析发现 VOMF 组与对照组基因表达量相似度低,这可能与样本量少有关。进一步对共同 DEGs 进行 GO 功能和 KEGG 通路富集分析,发现细胞周期信号通路、HIF-1 信号通路、MAPK 信号通路与 VOMF 干预 HPAH 的作用机制相关。结合文献调研和课题组前期研究后续选择细胞周期信号通路进行体外验证。Western blotting 结果显示, VOMF 能降低 PSMCs 中 CDK2、CDK4、Cyclin D1、Cyclin A2 蛋白表达,升高 p27Kip1 蛋白表达,提示 VOMF 可能通过调控细胞周期信号通路相关蛋白表达来干预 HPAH。

CDKs 和 Cyclin 是参与细胞周期调控的重要蛋白,在肺动脉高压的发生和发展中可能参与了细胞增殖、细胞凋亡和细胞迁移等重要过程<sup>[20]</sup>。CDKs 是细胞内组成型表达的一种核内丝-苏氨酸蛋白激酶,单独存在无活性,由 1 个蛋白激酶和 1 个调节亚基组成,调节亚基被称为 Cyclin<sup>[21]</sup>。在细胞分裂的 G<sub>1</sub> 阶段,CDK4 和 CDK6 与 Cyclin D 结合,促进细胞进入 S 阶段<sup>[22]</sup>;在 S 阶段,CDK2 与细胞周期蛋白 E 结合,推动 DNA 复制;在 G<sub>2</sub> 阶段,CDK1 与细胞周期蛋白 A 和 B 结合,细胞准备进入有丝分裂<sup>[23]</sup>。也有研究认为 Cyclin D1-MAPK 通路能够抑制 PSMCs 的增殖,可能是通过 MAPK 及其磷酸化进一步调控 Cyclin D1 在细胞的表达<sup>[24]</sup>。Cyclin A2 同样是在调节细胞周期和细胞分裂中起关键作用的蛋白质,与 CDK2 形成复合物,激活 CDK2 并使其磷酸化参与细胞周期进程的靶蛋白。这种细胞周期蛋白 CDK 复合物负责促进从 G<sub>1</sub> 期到 S 期以及从 G<sub>2</sub> 期到 M 期的转变<sup>[25-26]</sup>。本研究同时验证了 VOMF 会促使 CDK2 和 Cyclin A2 表达降低,提示 CDK2 和 Cyclin A2 可能改变细胞周期比例,最终减弱 PSMCs 增殖能力。Cui 等<sup>[27]</sup>研究表明,PAH 发生过程中 PSMCs 增殖作用使得 Cyclin D1、CDK4 活性增加,p27Kip1 磷酸化水平降低从而下调 p27Kip1,p27Kip1 在细胞周期调控中具有重要作用,其蛋白表达下调与细胞异常增殖关系密切。这与课题组研究及本文结论基本一致。此外,本研究对 HIF-1 信号通路的蛋白进行了验证,但是 VOMF 组和模型组的相关蛋白表达没有差异,可能的原因

是 VOMF 中的主要成分以单萜类和芳香族类化合物为主,对 HIF-1 信号通路敏感性较小有关。

综上,本研究基于课题组前期研究结果,即 VOMF 对低氧诱导的 PSMCs 增殖具有抑制作用,通过 RNA-seq 测序技术,发现与 HPAH 密切相关的信号通路为细胞周期信号通路。在 HPAH 发生时,细胞周期信号通路相关蛋白在促进肺血管收缩、PAECs 功能障碍、PSMCs 增殖、肺血管重构等方面发挥重要作用,可通过调控细胞周期相关蛋白发挥抗 HPAH 损伤的作用。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

#### 参考文献

- [1] Chen D W, Gao W X, Wang S X, *et al.* Critical effects of epigenetic regulation in pulmonary arterial hypertension [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2017, 74(20): 3789-3808.
- [2] Kovacs G, Dumitrescu D, Barner A, *et al.* Definition, clinical classification and initial diagnosis of pulmonary hypertension: Updated recommendations from the Cologne Consensus Conference 2018 [J]. *Int J Cardiol*, 2018, 272S: 11-19.
- [3] Sommer N, Strielkov I, Pak O, *et al.* Oxygen sensing and signal transduction in hypoxic pulmonary vasoconstriction [J]. *Eur Respir J*, 2016, 47(1): 288-303.
- [4] Xie Y B, Shi X F, Sheng K, *et al.* PI3K/Akt signaling transduction pathway, erythropoiesis and glycolysis in hypoxia (review) [J]. *Mol Med Rep*, 2019, 19(2): 783-791.
- [5] Vermeulen K, Van Bockstaele D R, Berneman Z N. The cell cycle: A review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer [J]. *Cell Prolif*, 2003, 36(3): 131-149.
- [6] Sitapara R, Lam T T, Gandjeva A, *et al.* Phosphoproteomic analysis of lung tissue from patients with pulmonary arterial hypertension [J]. *Pulm Circ*, 2021, 11(3): 20458940211031109.
- [7] 贾琪. 细胞周期蛋白依赖性激酶 9 (CDK9) 在肺动脉高压中的作用及机制研究 [D]. 武汉: 华中科技大学, 2019.
- [8] Luo J, Li H Y, Liu Z W, *et al.* Integrative analyses of gene expression profile reveal potential crucial roles of mitotic cell cycle and microtubule cytoskeleton in pulmonary artery hypertension [J]. *BMC Med Genomics*, 2020, 13(1): 86.
- [9] 马可, 南星梅, 赵婧, 等. 肉豆蔻的药理和毒理作用研究进展 [J]. *中药药理与临床*, 2022, 38(1): 218-224.
- [10] 刘润润, 孙爱清, 于小钧, 等. 肉豆蔻化学成分和药理作用研究进展及其质量标志物 (Q-Marker) 预测分析

- [J]. 中草药, 2023, 54(14): 4682-4700.
- [11] 马可, 南星梅, 苏姗姗, 等. 肉豆蔻挥发油对低氧诱导肺动脉平滑肌细胞增殖的抑制作用及其抗氧化活性 [J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2018, 32(7): 535-542.
- [12] 毛稼琦. 红景天苷对低氧诱导的大鼠肺动脉平滑肌细胞表型转化的影响 [D]. 西宁: 青海大学, 2022.
- [13] 蒋鸣. 肉豆蔻挥发油抑菌作用研究 [J]. 中国调味品, 2021, 46(1): 63-66.
- [14] 刘启艳, 詹伟, 彭玉. 大鼠平滑肌细胞培养研究进展与分析 [J]. 贵阳中医学院学报, 2019, 41(3): 76-82.
- [15] 丁兴, 孙莉, 王苒. 低氧性肺动脉高压发病机制研究进展 [J]. 临床肺科杂志, 2017, 22(7): 1318-1319.
- [16] Moral-Sanz J, Mahmoud A D, Ross F A, *et al.* AMP-activated protein kinase inhibits Kv1.5 channel currents of pulmonary arterial myocytes in response to hypoxia and inhibition of mitochondrial oxidative phosphorylation [J]. *J Physiol*, 2016, 594(17): 4901-4915.
- [17] He X, Song S S, Ayon R J, *et al.* Hypoxia selectively upregulates cation channels and increases cytosolic  $[Ca^{2+}]$  in pulmonary, but not coronary, arterial smooth muscle cells [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2018, 314(4): C504-C517.
- [18] 李志勤, 范媛, 魏安华. 肺动脉高压药物治疗新靶点及免疫调节治疗策略 [J]. 医药导报, 2022, 41(2): 201-206.
- [19] 马存, 冼少华, 相雨, 等. 肉豆蔻药理作用研究进展 [J]. 中国现代中药, 2017, 19(8): 1200-1206.
- [20] Muhr J, Hagey D W. The cell cycle and differentiation as integrated processes: Cyclins and CDKs reciprocally regulate Sox and Notch to balance stem cell maintenance [J]. *Bioessays*, 2021, 43(7): e2000285.
- [21] 杨振华, 吴军华, 朱莉萍, 等. 细胞周期素与卵巢癌关系的研究进展 [J]. 中国社区医师: 医学专业, 2012, 14(14): 5.
- [22] 许明召, 景凯, 崔贵, 等. MiR-522 促进食管癌增殖和转移的作用机制研究 [J]. 疑难病杂志, 2022, 21(1): 12-16.
- [23] 张道平, 刘起立, 姚昆鹏, 等. 基于生物信息学分析肝癌差异基因及潜在的中药干预 [J]. 中草药, 2022, 53(3): 788-798.
- [24] Qin L, Yang Y B, Yang Y X, *et al.* Inhibition of smooth muscle cell proliferation by ezetimibe via the cyclin D1-MAPK pathway [J]. *J Pharmacol Sci*, 2014, 125(3): 283-291.
- [25] Kim S S, Alves M J, Gygli P, *et al.* Identification of novel cyclin A2 binding site and nanomolar inhibitors of cyclin A2-CDK2 complex [J]. *Curr Comput Aided Drug Des*, 2021, 17(1): 57-68.
- [26] 潘剑锋, 尚方正, 马荣, 等. 周期蛋白和周期蛋白依赖性激酶及相关激酶抑制剂在细胞周期进程中的调控机制研究进展 [J]. 生物工程学报, 2023, 39(4): 1525-1547.
- [27] Cui C, Zhang H, Guo L N, *et al.* Inhibitory effect of NBL1 on PDGF-BB-induced human PASM C proliferation through blockade of PDGF $\beta$ -p38MAPK pathway [J]. *Biosci Rep*, 2016, 36(4): e00374.

[责任编辑 李亚楠]