

基于网络药理学和细胞实验探讨肉豆蔻对动脉粥样硬化的作用机制

卢淑娴¹,周志玲¹,张弋峰¹,余军²

(¹江西中医药大学转化医学中心,南昌 330045;²天普大学路易斯卡茨医学院,费城,美国 PA19140)

摘要 目的 探讨肉豆蔻防治动脉粥样硬化(AS)的潜在作用机制。方法 从数据库中获取肉豆蔻的主要活性成分及其与AS共有靶点;再利用ClusterProfile包和STRING数据库对共有靶点进行通路富集分析和PPI网络构建;基于Autodock工具进行关键靶基因与主要活性成分的分子对接分析;通过早期和晚期以及稳定和不稳定AS斑块的基因表达数据,验证关键靶点和主要通路在AS进展中的变化;采用Western blot和流式细胞术、YO-PRO-1/PI染色、TUNEL染色等实验验证其主要作用机制。结果 通过数据库筛选得到肉豆蔻9个活性成分共作用于293个AS相关靶基因,其中8个成分共同作用于57.0%的共有靶点。基因本体论(GO)和京都基因与基因组百科全书(KEGG)富集分析结果表明,肉豆蔻防治AS主要涉及氧化应激、炎症、脂代谢、流体剪切力以及细胞凋亡等通路。PPI网络揭示JUN、CASP3、MAPK3和AKT1为关键靶基因,主要参与调控细胞凋亡通路。分子对接分析表明,肉豆蔻的主要成分与上述靶基因有稳定的结合构象和较高的亲和力。整合早期和晚期及稳定和不稳定AS斑块的基因表达数据,发现白细胞凋亡通路在晚期和不稳定斑块中显著富集。细胞实验进一步证实,肉豆蔻干预可降低Cleaved-CASP3($P=0.04$)和p-MAPK3($P=0.0003$)水平,上调p-AKT1($P=0.004$)水平,抑制巨噬细胞凋亡。结论 肉豆蔻可能通过调控氧化应激、炎症反应、脂代谢、流体剪切力以及细胞凋亡等通路干预AS进程,其中CASP3、MAPK3和AKT1为抑制巨噬细胞凋亡、发挥抗AS的重要靶点。

关键词 肉豆蔻;动脉粥样硬化;网络药理学;分子对接分析;巨噬细胞凋亡

中图分类号 R285.5

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2026)04-0618-10

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2026.04.005

动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)是一种伴有巨噬细胞显著浸润的慢性血管炎症性疾病。肉豆蔻为传统药用植物,常用于配伍方剂,有降血脂、抗菌、抗抑郁、抗氧化、抗炎等药理作用^[1]。已有研究^[2]表明其可显著降低AS斑块面积,其作用机制可能通过上调三磷酸腺苷结合转运体A1(ATP binding cassette transporter A1, ABCA1)表达,促进胆固醇外排,减少巨噬细胞内的脂质蓄积,从而降低组织脂质含量。然而,现有研究^[3]多聚焦于单一或少数活性成分(如谷甾醇、挥发油等),而肉豆蔻含黄酮、萜类、酚类等多种成分可能存在协同作用,但尚未被充分探讨。该研究基于网络药理学、分子对接

和细胞实验等方法,探讨天然产物肉豆蔻在治疗AS中的有效活性成分及其潜在作用机制,为其防治AS的基础研究和临床应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

1.1.1 主要试剂 肉豆蔻提取物(货号:W530427)购自美国Sigma-Aldrich公司;RAW264.7小鼠单核巨噬细胞白血病细胞(货号:TCM-C766)购自上海海星生物技术有限公司。Active + Pro Caspase-3重组兔单克隆抗体(货号:ET1608-64)购自杭州华安生物技术有限公司;p-MAPK3、MAPK3、p-AKT1、AKT1抗体(货号:9101S、4696、75692、13461)购自美国Cell Signaling Technology公司;p-JUN、JUN抗体(货号:HY-P80456、HY-P80084)购自上海MCE公司;热休克蛋白90(heat shock protein 90, HSP90)小鼠单克隆抗体(货号:TA500494)购自美国OriGene Technologies公司。HRP标记的山羊抗小鼠IgG(H+L)和山羊抗兔IgG(H+L)二抗(货号:SA00001-1、SA00001-2)购自武汉Proteintech公司;细胞凋亡检

2026-01-24 接收

基金项目:江西省科技专项资金项目(编号:20232BAB216012);江西省大学生创新创业训练计划项目(编号:S202310412091)

作者简介:卢淑娴,女,硕士研究生;

张弋峰,男,博士,副教授,通信作者,E-mail:zyf489662913@163.com;

余军,男,博士,教授,通信作者,E-mail:jun.yu@temp.le.edu

测试剂盒(货号:40302ES20)购自上海翌圣生物科技有限公司;YO-PRO-1/碘化丙啶(YO-PRO-1/propidium iodide, YO-PRO-1/PI)染色试剂盒(货号:C1075S)和末端脱氧核苷酸转移酶介导的dUTP缺口末端标记法(terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick-end labeling, TUNEL)染色试剂盒(货号:C1090)均购自上海碧云天生物技术有限公司。

1.1.2 主要仪器 细胞培养箱(型号:3111)、低温离心机(型号:Legend Micro 17R)购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司;超净工作台(型号:HFsafe-900)购自香港 Heal Force 公司;蛋白免疫印迹电泳仪(型号:1645050)购自美国 Bio-Rad 公司;凝胶成像系统(型号:Amersham Imager 600)购自上海思拓凡公司;酶标仪(型号:EnVision)购自美国 PerkinElmer 公司;流式细胞仪(型号:CytoFLEX)购自上海贝克曼库尔特公司;正置荧光显微镜(型号:Ni-U)购自日本 Nikon 公司。

1.2 网络药理学研究

1.2.1 肉豆蔻的活性成分获取及靶点筛选 为筛选肉豆蔻的活性成分及其作用靶点,本研究采用多数据库联合筛选策略。首先,通过 TCMSP 数据库(<https://old.tcms-pe.com/tcmsp.php>),根据口服生物利用度(oral bioavailability, OB)≥30%和类药性(drug-likeness, DL)≥0.18 标准,筛选出具有较好吸收性和成药性的活性成分及其潜在靶点。随后,利用 Uniprot 数据库(<https://www.uniprot.org/>)对靶点蛋白进行查询,获取并标准化人类基因名称。进一步通过 SwissTargetPrediction(<http://www.swisstargetprediction.ch/>)和 PharmMapper(<http://www.lilab-ecust.cn/pharmmapper/>)数据库挖掘更多潜在靶点。最终,整合上述数据库结果,去除重复项,获得肉豆蔻有效成分作用靶点,用于后续的研究。

1.2.2 AS 靶点及交集靶点的获取 本研究通过 DrugBank (<https://go.drugbank.com/>)、OMIM (<https://omim.org/>)、GAD (<https://geneticassociationdb.nih.gov/>)和 DisGeNET(<http://www.disgenet.org/>)数据库,以“AS”为关键词检索相关靶点。整合不同数据库结果并去除重复项后,最终获得了 AS 的潜在靶点。随后,使用 R 语言对肉豆蔻靶点与 AS 靶点进行交集分析,并通过运行 venny. R 脚本绘制韦恩图,从而获得二者的共同作用靶点。

1.2.3 生物学功能与通路分析 通过 R 语言中

“clusterProfile”包对肉豆蔻和 AS 共有靶点进行基因本体论(gene ontology, GO)富集分析和京都基因与基因组百科全书(Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)富集分析,并以校正后 $P \leq 0.01$ 作为显著性阈值筛选标准。富集结果通过 R 语言中“dotplot”函数进行可视化,展示主要的生物过程和信号通路。

1.2.4 蛋白质相互作用(protein-protein interaction, PPI)网络构建及关键靶点筛选 使用 STRING 平台(<https://www.string.db.org/>)对共同靶点进行 PPI 网络分析,选择“Multiple Proteins”模式,物种设置为“Homo sapiens”,并采用默认参数导出 TSV 格式文件。随后,导入 Cytoscape 进行可视化。通过 Network Analysis 插件进行拓扑筛选,以自由度、接近中心性及介度中心性均≥中位数为标准,共获得 107 个核心靶点,并将前 10 个关键节点以红色高亮显示。

1.2.5 肉豆蔻的活性成分与关键靶点分子对接 从 PubChem 获取筛选活性成分的 SDF 文件,经 Chem3D 软件最小结合能优化后转换为 mol2 格式。接着,从 RCSB PDB 数据库下载关键基因的蛋白结构(pdb 格式),并在 PyMOL 软件中去除水分子和小分子配体。随后将配体与蛋白分别导入 AutoDock Tools 加氢并保存为 pdbqt 文件,通过 AutoDock Vina 进行分子对接,设置靶蛋白活性口袋参数并计算结合能,再用 PyMOL 对对接构象进行可视化。结合能越低表示亲和力越强,通常 < -20.92 kJ/mol 视为结合稳定、对接效果良好。

1.2.6 基因表达综合数据库(gene expression omnibus, GEO)数据集获取 通过 NCBI 网站(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)中 GEO 数据库获取 GSE28829 和 GSE120521 数据集,其中 GSE28829 数据集中包含 29 个 AS 斑块样本(其中早期斑块 15 个,晚期斑块 14 个)的基因表达谱数据,而 GSE120521 数据集中包含 8 个样本(4 对稳定和不稳定斑块区域样本)的 RNA 测序数据。

1.2.7 差异基因表达(differentially expressed genes, DEGs)和基因集富集(gene set enrichment analysis, GSEA)分析 通过 DESeq2 包对基因表达数据进行标准化处理,并鉴定差异表达基因。校正后的 P 值(P_{adjust}) < 0.05 时,该基因被视为差异表达基因。GSEA 分析使用 GSEA 软件 4.1.0 进行,参考基因集 c5.bp.v7.0.symbols.gmt 从官方 GSEA 下载。基因集的显著性阈值设为校正后的 $P < 0.05$ 。

1.3 细胞实验研究

1.3.1 肉豆蔻溶液制备 精密称取肉豆蔻提取物粉末,将其溶解于无菌的生理盐水中,充分混匀后制成 1 mg/mL 的母液,并分装保存于 4 °C 冰箱中备用。

1.3.2 细胞提取和培养 将 RAW264.7 细胞置于 37 °C、5% CO₂、饱和湿度的培养箱中,在含 10% 胎牛血清的高糖 DMEM 培养基中进行培养。当细胞生长至 80%~90% 汇合度时,使用细胞刮刀刮取其脱落,随后进行传代或接种铺板。

1.3.3 CCK-8 法检测肉豆蔻对 RAW264.7 细胞的生长抑制作用 采用 CCK-8 试剂检测处理后细胞的吸光度(absorbance, A)值,以评估 RAW264.7 细胞活力。参考预实验和文献报道^[2]的活性范围设定,实验共分为 7 组,包括对照组及 6 组给药组。给药组中肉豆蔻浓度分别为 1、10、20、50、100 和 200 μmol/L。将处于对数生长期的 RAW264.7 细胞接种于 96 孔板中,贴壁后更换为含不同浓度药物的培养基,24 h 后,弃去原培养基,向每孔加入含 10% CCK-8 试剂的新鲜培养基,于 37 °C 孵育 30 min,随后在 450 nm 波长下测定各孔的 A 值。

1.3.4 实验分组和干预 本研究设对照组、H₂O₂ 模型组和肉豆蔻给药组。模型组以 300 μmol/L H₂O₂ 处理细胞 2 h 建立氧化应激模型;给药组先以 20 μmol/L 肉豆蔻预处理 24 h,再加入 300 μmol/L H₂O₂ 处理 2 h;对照组则在无药物的完全培养基中培养。

1.3.5 Western blot 检测蛋白浓度 将对数生长期的 RAW264.7 细胞接种于 6 孔板并完成药物处理后,用 RIPA 裂解液提取总蛋白,BCA 法测定蛋白浓度。随后进行 SDS-PAGE 电泳并将蛋白转膜至 PVDF 膜。室温封闭 1 h 后加入一抗,4 °C 孵育过夜。TBST 洗膜 3 次后加入二抗,于室温孵育 1 h,再次洗膜 3 次。最终以化学发光法显影,并使用 ImageJ 分析灰度值,以 HSP90 为内参计算目标蛋白的相对表达量。

1.3.6 流式细胞术 按上述方式处理细胞后,收集上清液和细胞沉淀,用 100 μL 1× Binding buffer 重悬,加入 5 μL Annexin-FITC 和 2 μL PI,在避光条件下孵育 15 min。随后加入 400 μL Binding Buffer 混匀,用流式细胞仪检测。Annexin V⁺FITC/PI⁻ 为早期凋亡,Annexin V⁺FITC/PI⁺ 为晚期凋亡,凋亡率为早期与晚期凋亡细胞比例之和。

1.3.7 YO-PRO-1/PI 染色 将 RAW264.7 细胞接种于 24 孔板中,每孔约 10 万个细胞,细胞贴壁后进行药物干预。用 4% PFA 室温固定 30 min,PBS 洗 3 次,加入染色工作液 100~200 μL,室温孵育 30 min。PBS 洗 3 次,每次 5 min,控干水分后使用封片剂封片。荧光显微镜下观察并拍摄照片,使用 ImageJ 软件统计阳性细胞数量。

1.3.8 TUNEL 染色 与 1.3.7 实验条件一致,将处理好的细胞用 4% PFA 室温固定 30 min,PBS 洗 3 次。用 0.1% Triton X-100 室温通透 8 min 后 PBS 洗 2 次。随后与含有末端转移酶和标记核苷酸的 TUNEL 反应液在 37 °C 避光孵育 60 min,用 DAPI 进行细胞核复染后封片观察,通过 ImageJ 软件统计阳性细胞数量。

1.4 统计学处理 实验数据分析使用 GraphPad Prism V8.0 统计软件进行,多组间数据若符合正态分布且符合方差齐性检验,用 One-way ANOVA 单因素方差分析,组间两两比较采用 Tukey 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肉豆蔻主要活性成分干预 AS 相关靶点的网络药理学分析结果

2.1.1 肉豆蔻的主要活性成分及靶点 为获得肉豆蔻的活性成分及其潜在靶点,首先通过 TCMSP 数据库检索其主要活性成分,并以 OB \geq 30% 和 DL \geq 0.18 作为筛选标准,筛选出 9 个具有较好的口服吸收效果和较高成药性的有效活性成分(表 1)。随后,利用 TCMSP、SwissTargetPrediction 和 PharmMapper 数据库检索这些活性成分的潜在作用靶点。在这 3 个数据库中分别检索到 59、372 和 651 个作用靶点。综合 3 个数据库结果后,每个成分平均有 342 个潜在作用靶点,删除重复靶点后得到 941 个肉豆蔻活性成分的作用靶点。

2.1.2 AS 靶基因及其与肉豆蔻的共同靶点 为系统性获取 AS 相关的靶基因,利用 DrugBank、GAD、OMIM 和 DisGeNET 数据库对 AS 的靶基因进行检索,获得靶基因数量分别为 46、354、3 和 2 044 个。经去重后,共得到 2 184 个与 AS 相关的靶基因。随后,对肉豆蔻活性成分与 AS 靶基因进行交集分析,获得 293 个共同靶点(图 1)。进一步分析肉豆蔻的 9 个主要活性成分作用于 293 个共同靶基因的数量,发现除 Compound 8 作用于其中的 13.7% (40/293)

表 1 肉豆蔻的主要活性成分信息

Tab. 1 Information about the main active ingredients of Myristica fragrans

Number	Mol ID	Molecule name	OB (%)	DL	Target number
comp1	MOL000358	beta-sitosterol	36.91	0.75	273
comp2	MOL007920	meso-1,4-Bis-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-2,3-dimethylbutane	31.32	0.26	363
comp3	MOL009243	Isoguaiacin	48.78	0.31	356
comp4	MOL009254	galbacin	61.00	0.53	339
comp5	MOL009255	5-[(2S,3S)-7-methoxy-3-methyl-oxole5-[(E)-prop-1-enyl]-2,3-dihydrobenzofuran-2-yl]-1,3-benzodi	53.11	0.40	385
comp6	MOL009259	Kudos	45.06	0.38	372
comp7	MOL009263	saucernetindiol	41.85	0.32	317
comp8	MOL009264	tetrahydrofuroguaiacin B	62.86	0.32	318
comp9	MOL009265	threo-austrobailignan-5	49.49	0.32	356

个靶基因外,其余成分平均作用于 57.0% (167/293) 的共同靶基因。见表 2。

2.1.3 GO 和 KEGG 富集分析 为阐明肉豆蔻作用 AS 的潜在机制,本研究对肉豆蔻和 AS 的共同靶基因进行了 GO 和 KEGG 富集分析,以校正后的 $P < 0.01$ 且 $Count > 10$ 为显著标准。结果显示,293 个靶基因主要富集在 762 个 GO 生物学过程和 122 个 KEGG 信号通路,其中显著性前 10 的 GO 和 KEGG 通路见图 2。GO 富集主要集中于脂多糖应答、氧化应激、炎症调控及脂肪酸代谢(图 2A)。KEGG 通路富集结果中,显著性前 10 的 KEGG 通路中主要涉及脂质和动脉粥样硬化、Rap1 信号通路及细胞凋亡等关键通路(图 2B)。

2.1.4 PPI 网络构建筛选关键靶基因 为鉴别肉豆蔻作用 AS 的关键靶基因,通过 STRING 数据库构

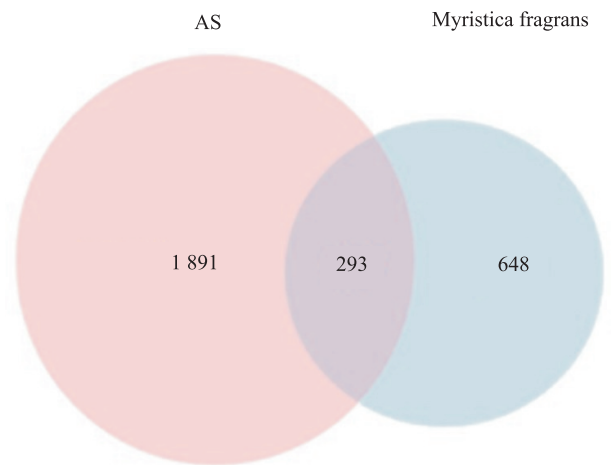


图 1 肉豆蔻和 AS 共同靶点

Fig. 1 Common targets of Myristica fragrans and AS

Venn diagram of common targets between Myristica fragrans and the disease; Pink: represents AS disease targets; Blue: represents Myristica fragrans targets; Purple: represents the overlapping targets.

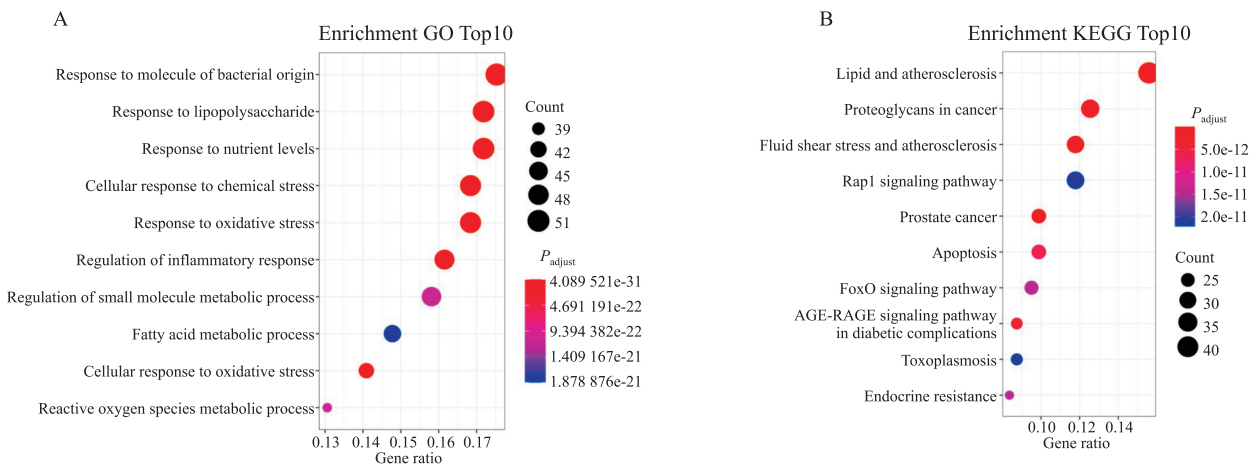


图 2 肉豆蔻和 AS 共同靶点的 GO 和 KEGG 富集通路

Fig. 2 GO and KEGG enrichment pathways of the shared targets between Myristica fragrans and AS

A: GO functional enrichment bubble plot; B: KEGG pathway enrichment bubble plot; Y-axis: Pathway names; X-axis: Gene ratio; Bubble size: Number of genes in the term; Color: enrichment significance P value.

表2 肉豆蔻主要活性成分的靶点数量

Tab. 2 Major active compounds of *Myristica fragrans* and corresponding target numbers

Number	Compound	Target number
comp1	Beta-sitosterol	141
comp2	Dimethylbutane	175
comp3	Isoguaiaicin	169
comp4	Galbacin	165
comp5	Benzodioxole	178
comp6	Kudos	177
comp7	Saucernetinidol	163
comp8	Tetrahydrofuroguaiaicin B	40
comp9	Austrobailligan	165

建 PPI 共表达网络。将 293 个共同靶点基因导入 STRING 并经 Cytoscape 可视化, 获得包含 293 个节点和 3 903 条相互作用边的网络。利用 Network Analyzer 按自由度、接近中心性、介度中心性大于或等于中位数为筛选条件, 获得 107 个核心靶基因 (图 3A)。其中连接度 ≥ 66 的关键节点包括 *ALB* (98)、*AKT1* (95)、*CASP3* (75)、*SRC* (75)、*JUN* (74)、*MAPK3* (74)、*EGFR* (72)、*PPARG* (71)、*MMP9* (69)、*HIF1A* (66) 及 *PTGS2* (66) (图 3B)。通过对上述关键靶基因的生物学功能注释分析提示, 其中 *JUN*、*CASP3*、*MAPK3* 和 *AKT1* 基因参与细胞凋亡相关信号通路。

2.1.5 肉豆蔻关键活性成分与核心靶点的分子对

接 为明确肉豆蔻中主要活性成分与参与细胞凋亡相关关键靶基因之间的结合能力, 选取 *JUN*、*CASP3*、*MAPK3* 和 *AKT1* 四个参与凋亡信号通路的核心靶点进行分子对接分析。靶点蛋白三维结构分别从 PDB 数据库中获取, PDB ID 分别为 2fpd (*JUN*)、5i9t (*CASP3*)、6ges (*MAPK3*)、4ejn (*AKT1*)。结果显示, 各活性成分与四个靶蛋白的最低结合能均 < -20.92 kJ/mol (表 3), 提示其结合构象稳定、相互作用较强, 可能通过调控这些靶点参与凋亡通路。

2.1.6 肉豆蔻的核心靶点及其调控的凋亡通路在 AS 进展中的变化 为明确肉豆蔻核心靶点及其调控的细胞凋亡通路在 AS 进展中的激活情况, 分析 GEO 数据库中 AS 斑块早期和晚期 (GSE28829), 以及稳定和不稳定斑块 (GSE120521) 的基因表达数据集。差异分析共鉴定出 2 600 个 (早期 vs 晚期) 和 4 365 个 (稳定 vs 不稳定) 差异基因 (图 4A、4D)。基于差异基因的 GSEA 结果显示, 白细胞凋亡通路在晚期斑块 (NES=2.31, $P_{\text{adjust}}=0.00006$) 和不稳定斑块 (NES=2.33, $P_{\text{adjust}}=0.0003$) 中均显著富集 (图 4B、4E)。进一步分析显示, 除 *AKT1* 在早期和晚期斑块中基因表达存在显著差异外, 其余基因在不同病程阶段未呈现显著变化 (图 4C、4F)。

2.2 细胞实验验证肉豆蔻调控凋亡相关靶基因蛋白活性抑制巨噬细胞凋亡

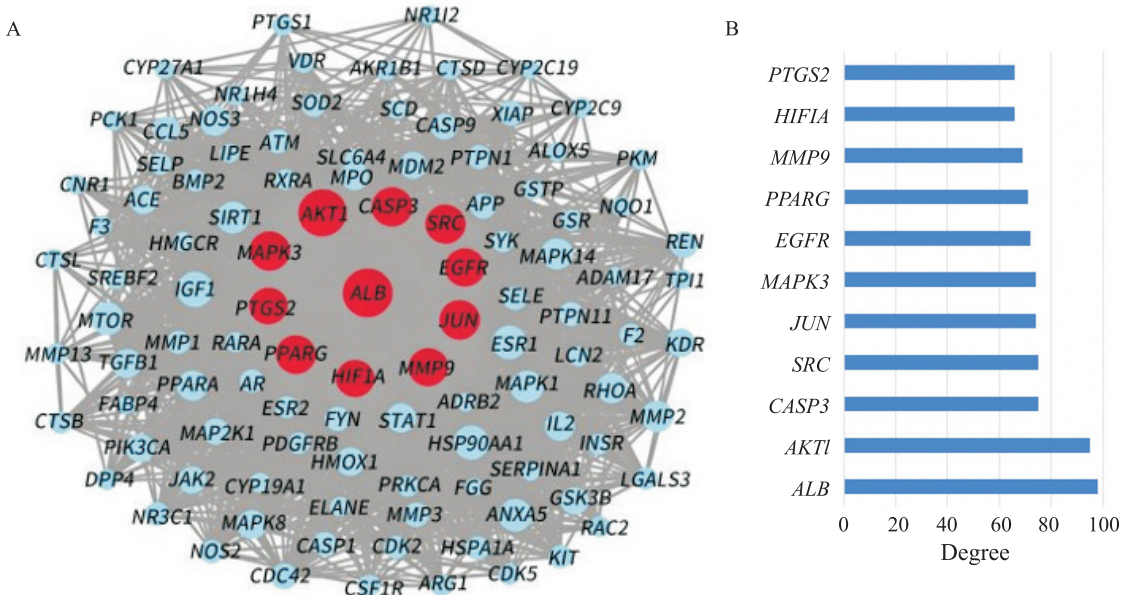


图3 肉豆蔻-AS 共有靶点的 PPI 网络图

Fig. 3 PPI Network diagram of common genes shared by *Myristica fragrans*-AS

A: PPI network of *Myristica fragrans*-AS shared targets; Red nodes: Key target genes; Blue nodes: Other shared genes; B: Bar plot of degree centrality for key target genes.

表3 分子对接信息表

Tab. 3 Information table of molecular docking

Target	PDB ID	Compound	Binding energy/ (kJ/mol)	
JUN	2fpd	Comp. 1	-27.614 4	
		CASP3	Comp. 1	-33.053 6
			Comp. 2	-30.961 6
			Comp. 3	-32.216 8
			Comp. 4	-36.819 2
			Comp. 5	-34.308 8
		Comp. 6	-31.798 4	
		Comp. 7	-29.706 4	
		Comp. 9	-30.543 2	
MAPK3	6ges	Comp. 2	-28.451 2	
		Comp. 3	-32.635 2	
AKT1	4ejn	Comp. 2	-35.982 4	
		Comp. 3	-35.982 4	
		Comp. 6	-40.166 4	
		Comp. 7	-37.656 0	
Comp. 9	-34.727 2			

2.2.1 肉豆蔻对巨噬细胞的生长抑制作用 为筛选肉豆蔻提取物对RAW264.7细胞的适宜处理浓度,分别以不同剂量处理细胞24 h,并采用CCK-8法检测细胞活力。结果显示,各给药组细胞活力均保

持在95%以上,与空白对照组相比,差异无统计学意义,细胞生长状态良好(图5)。结合CCK-8结果及预实验数据,最终选定20 μmol/L作为后续实验的最佳处理浓度。

2.2.2 肉豆蔻对巨噬细胞JUN、CASP3、MAPK3和AKT1蛋白活性的作用 为验证肉豆蔻对巨噬细胞凋亡相关蛋白表达的影响,采用Western blot检测各组JUN、CASP3、MAPK3、AKT1及其活性形式(p-JUN、Cleaved-CASP3、p-MAPK3、p-AKT1)的表达水平。与对照组比较,模型组Cleaved-CASP3($P=0.0064$)和p-MAPK3($P=0.0003$)表达水平升高,p-AKT1($P=0.002$)表达水平降低;与模型组比较,肉豆蔻干预组Cleaved-CASP3($P=0.04$)和p-MAPK3($P=0.0003$)表达水平下降,p-AKT1($P=0.004$)表达水平升高,各组p-JUN表达水平差异无统计学意义。见图6。

2.2.3 肉豆蔻对巨噬细胞凋亡的作用 为验证肉豆蔻的抗凋亡作用,采用流式细胞术及YO-PRO-1/PI双染和TUNEL染色对H₂O₂诱导的巨噬细胞凋亡进行评估。流式结果显示,肉豆蔻处理组的凋亡比例较模型组降低($P=0.0012$)。YO-PRO-1/PI双染

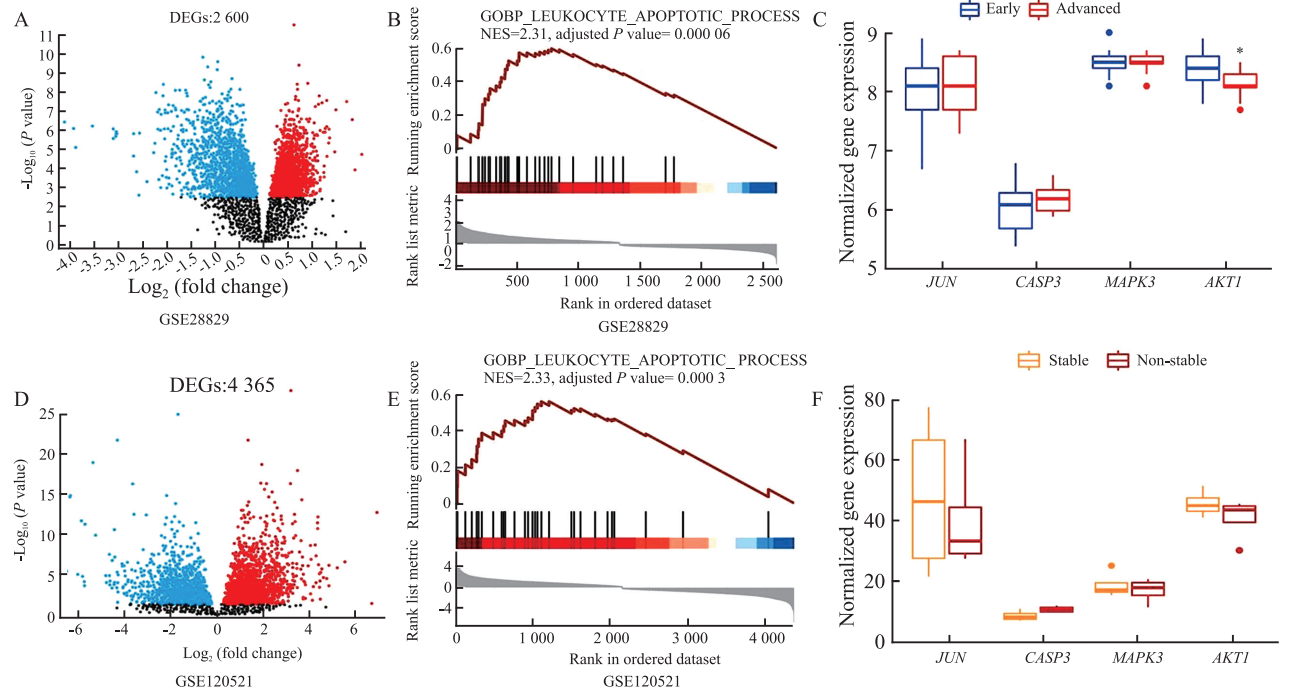


图4 肉豆蔻核心靶点及其调控的凋亡通路在AS进展中的变化

Fig. 4 Alterations in Myristica fragrans core targets and apoptosis-related pathways during AS progression

A: Volcano plot of gene expression profiles in early vs late-stage AS plaques; B: Enrichment of leukocyte apoptosis pathway in early and late-stage plaques; C: Expression patterns of Myristica fragrans core target genes (*JUN*, *CASP3*, *MAPK3*, *AKT1*) in early and late-stage AS plaques; D: Volcano plot of gene expression profiles in stable vs unstable AS plaques; E: Enrichment of leukocyte apoptosis pathway in stable and unstable plaques; F: Expression patterns of Myristica fragrans core target genes (*JUN*, *CASP3*, *MAPK3*, *AKT1*) in stable and unstable AS plaques; * $P<0.05$ vs Early.

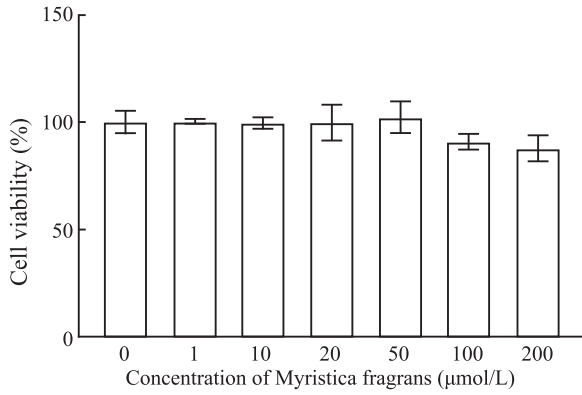


图5 肉豆蔻对RAW264.7细胞活力的影响 (n=5)

Fig. 5 The effects of Myristica fragrans on the viability of RAW264.7 cells (n=5)

结果显示,与模型组比较,肉豆蔻处理组早期凋亡细胞(YO-PRO-1⁺) (P=0.001 2)及晚期凋亡/坏死(PI⁺) (P=0.009 7)细胞比例均下降。TUNEL染色结果显示,与对照组比较,模型组TUNEL阳性细胞增加(P=0.000 3),而与模型组比较,肉豆蔻处理组TUNEL阳性细胞减少(P=0.010 5)。见图7。

3 讨论

肉豆蔻作为传统蒙药,具有降脂、抗炎、抗氧化等多重药理活性。已有研究^[4]证实可降低血脂,改善一氧化氮水平并降低AS斑块面积,且可通过激活GATA3/LXRα通路上调ABCA1表达,促进巨噬细胞胆固醇外排以抑制AS进展^[2]。但整体机制仍未阐明。本研究结合网络药理学、分子对接及细胞实验,系统解析其潜在活性成分及抗AS机制,为后续

药效机制研究与临床转化提供基础。

通过TCMSP筛选并与AS相关基因比对共获293个靶点,8个主要成分可作用于其中57.0%靶点,提示肉豆蔻可能通过多成分、多靶点和多途径协同发挥效应。 β -sitosterol、galbacin、tetrahydrofuroguaiacin B、isoguaiacin等为核心成分,其中 β -sitosterol具有抗凋亡、抗氧化与抗肿瘤等作用^[5]。而其他成分的研究相对较少,但仍可能在整体效应中发挥作用。GO和KEGG分析显示,其靶点主要涉及氧化应激、炎症反应、脂质代谢、流体剪切应力以及细胞凋亡等通路,这些通路均是AS进展的关键驱动因素^[6]。提示肉豆蔻可能通过调控氧化应激、炎症、脂质代谢、流体剪切应力和细胞凋亡等通路,发挥抗AS的作用。

PPI网络分析获得11个核心基因,其中CASP3、AKT1、JUN和MAPK3均参与细胞凋亡通路。细胞凋亡贯穿AS的全过程,其失衡会导致斑块细胞过度死亡、斑块稳定性下降并加速病程^[7]。CASP3作为凋亡效应子位于级联反应末端,通过酶原切割介导细胞程序性死亡^[8];AKT1在细胞代谢与周期调控中发挥中心作用,其磷酸化下降会促进细胞凋亡^[9]。JUN是核转录激活蛋白-1的组成成分,参与增殖与凋亡调控,氧化应激可增强其活性并放大凋亡信号^[10]。MAPK3则参与细胞周期调控,氧化应激可促使其磷酸化并诱导细胞凋亡^[11]。通过分子对接分析发现,肉豆蔻中活性成分与细胞凋亡相关的四个关键靶基因的结合能均小于-20.92 kJ/mol,结合构

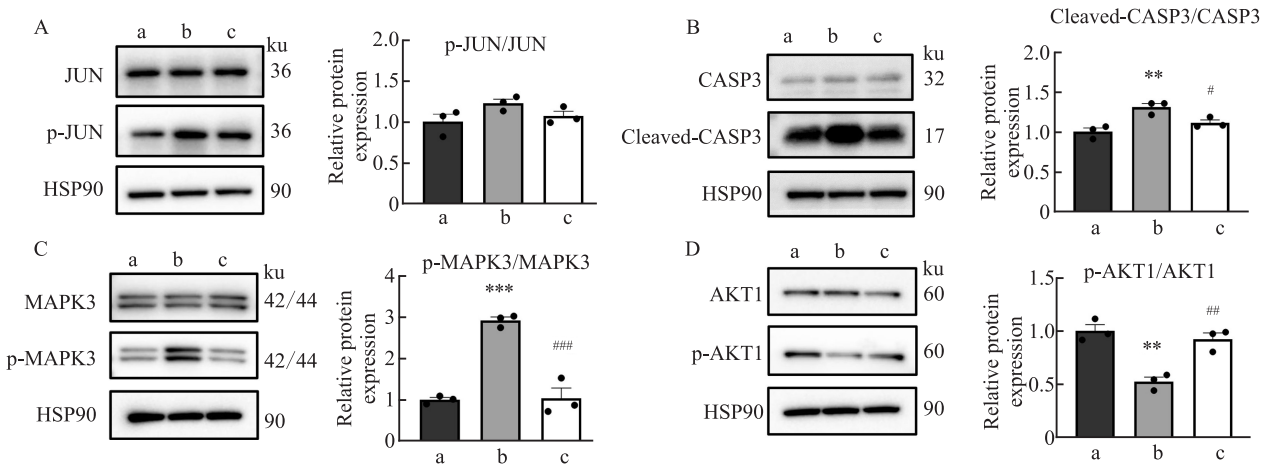


图6 肉豆蔻对JUN、CASP3、MAPK3和AKT1蛋白活性及凋亡的作用 (n=3)

Fig. 6 The effects of Myristica fragrans on the activity of JUN, CASP3, MAPK3, and AKT1 proteins and apoptosis (n=3)

A-D: Expression and quantification of p-JUN, cleaved-CASP3, p-MAPK3, and p-AKT1 proteins in control, model, and Myristica fragrans-treated groups; a: Control group; b: Model group; c: Myristica fragrans-treated group; **P<0.01, ***P<0.001 vs Control group; #P<0.05, ##P<0.01, ###P<0.001 vs Model group.

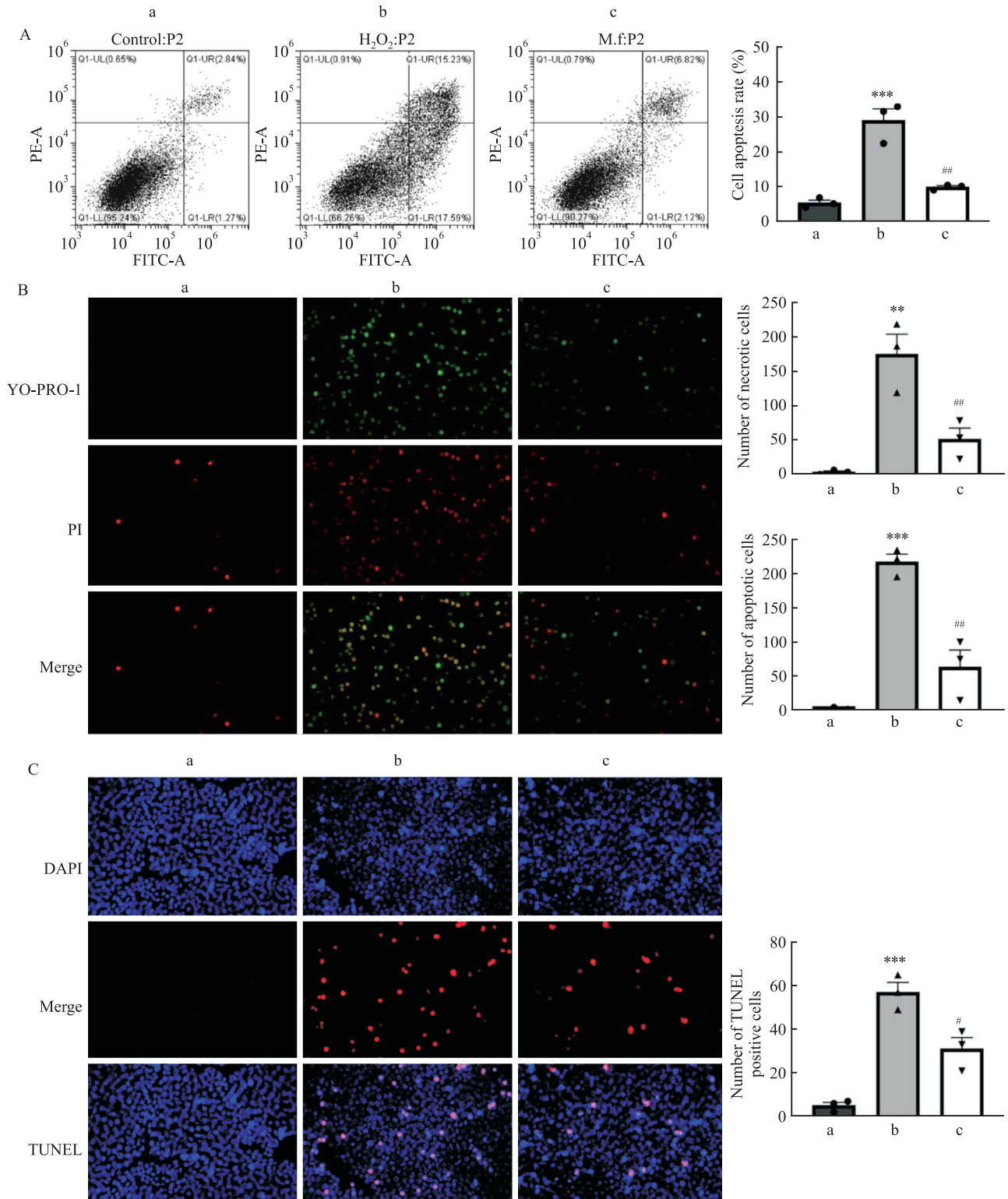


图7 肉豆蔻对巨噬细胞凋亡的作用 (n=3)

Fig. 7 The effects of Myristica fragrans on macrophage apoptosis (n=3)

A: Flow cytometry representative plots and quantitative analysis of each group; B: YO-PRO-1 and PI double-staining representative images and statistical results of each group $\times 200$; C: TUNEL staining representative micrographs and quantitative analysis of each group $\times 200$; a: Control group; b: Model group; c: Myristica fragrans-treated groups; ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs Control group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs Model group.

象稳定,表明其与靶蛋白具有较强的亲和力。综上所述,细胞凋亡通路可能是肉豆蔻防治AS的重要作用机制,而*CASP3*、*AKT1*、*JUN*和*MAPK3*等核心基因为潜在关键调控靶点。

在AS进展过程中,本研究发现白细胞凋亡在AS晚期及不稳定斑块中显著富集,提示其可能AS进展及斑块稳定性转变过程中处于持续激活状态。巨噬细胞作为重要的免疫白细胞,摄取氧化低密度脂蛋白形成泡沫细胞是斑块形成的重要特征^[12],而晚期凋亡会导致细胞内容物释放并扩大坏死核心,降低斑块稳定性并增加破裂与血栓风险^[13]。进一步结果显示除*AKT1*外,其余凋亡相关靶基因在AS进展中的表达无显著差异,提示肉豆蔻可能调控蛋白活性而非基因转录。细胞实验表明,肉豆蔻干预可显著下调Cleaved-CASP3和p-MAPK3蛋白的表达水平,上调p-AKT1蛋白水平,并对p-JUN呈抑制趋势。流式细胞术、YO-PRO-1/PI双染与TUNEL染色均表明,肉豆蔻可显著降低凋亡细胞比例,抑制H₂O₂诱导的巨噬细胞凋亡。

综上所述,本研究通过网络药理学分析及实验验证表明,肉豆蔻可能通过调控*CASP3*、*MAPK3*和*AKT1*的活性,抑制巨噬细胞凋亡通路,从而发挥抗AS的作用。尽管该研究为阐明肉豆蔻抗AS的潜在机制提供了理论依据,但仍以体外实验为主,其在内皮细胞、血管平滑肌细胞及其他免疫细胞中的作用尚不明确,未来仍需结合多种细胞和动物模型进一步深入研究,以为临床转化奠定更坚实的基础。

参考文献

- [1] Qi J, Bai Y, Mu Q, et al. Nutmeg: a review on basic source, traditional use, chemical components, pharmacological activities, mechanism, and quality control [J]. *Planta Med*, 2025. doi:10.1055/a-2623-1165. doi:10.1055/a-2623-1165.
- [2] Liu S, Gao J, He L, et al. *Myristica fragrans* promotes ABCA1 expression and cholesterol efflux in THP-1-derived macrophages [J]. *Acta Biochim Biophys Sin*, 2021, 53 (1) : 63-71. doi: 10.1093/abbs/gmaa146.
- [3] Luo J, Yang X, Bai M, et al. *Myristica fragrans*: a comprehensive review of its botanical characterization, traditional uses, phytochemistry, and pharmacological properties [J]. *J Ethnopharmacol*, 2025, 358: 120916. doi: 10.1016/j.jep. 2025. 120916.
- [4] 吴玉小, 丽丽, 萨仁高娃, 等. 蒙药吉如很新-2号复方及其部分成分对动脉粥样硬化的防治作用研究[J]. *内蒙古医科大学学报*, 2018, 40 (5) : 469-73. doi: 10.16343/j.cnki.issn.2095-512x.2018.05.010.
- [4] Wu Y X, Li L, Sa R G W, et al. Investigate the preventive effects of the New-No. 2 and its component a mogolian medicine, on the atherosclerosis in rabbits [J]. *J Inn Mong Med Univ*, 2018, 40 (5) : 469-73. doi: 10.16343/j.cnki.issn.2095-512x.2018.05.010.
- [5] Wu R, Chen N, Li J, et al. β -Sitosterol attenuates obstructive sleep apnea-related myocardial injury via MALAT1-mediated HIF-1 α regulation [J]. *Front Pharmacol*, 2025, 16: 1692758. doi: 10.3389/fphar.2025.1692758.
- [6] Pollak A W. Updates in antithrombotic therapy in coronary and peripheral artery disease [J]. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 2025, 2025 (1) : 34-8. doi: 10.1182/hematology.2025000684.
- [7] De Meyer G R Y, Zurek M, Puylaert P, et al. Programmed death of macrophages in atherosclerosis: mechanisms and therapeutic targets [J]. *Nat Rev Cardiol*, 2024, 21 (5) : 312-25. doi: 10.1038/s41569-023-00957-0.
- [8] Li M T, Xie L, Jiang H M, et al. Role of licochalcone a in potential pharmacological therapy: a review [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 878776. doi: 10.3389/fphar.2022.878776.
- [9] Xu C, Deng Y, Man J, et al. Unveiling the renoprotective mechanisms of schisandrin B in ischemia-reperfusion injury through transcriptomic and pharmacological analysis [J]. *Drug Des Devel Ther*, 2024, 18: 4241-56. doi: 10.2147/DDDT.S489458.
- [10] de los Reyes Corrales T, Losada-Pérez M, Casas-Tintó S, et al. JNK pathway in CNS pathologies [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22 (8):3883. doi:10.3390/ijms22083883.
- [11] Li J, Xie X, Lu L, et al. miR-196a-5p suppresses the MAPK/ERK pathway by targeting HOXA7 to regulate the proliferation and apoptosis of placental trophoblasts in gestational diabetes [J]. *Placenta*, 2025, 172: 167-78. doi: 10.1016/j.placenta.2025.11.006.
- [12] 程煦, 陈心严, 陈婷婷, 等. SPARCL1在动脉粥样硬化斑块形成中的作用研究[J]. *安徽医科大学学报*, 2024, 59(3): 473-8. doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.03.016.
- [12] Cheng X, Chen X Y, Chen T T, et al. The role of SPARCL1 in atherosclerotic plaque formation [J]. *Acta Univ Med Anhui*, 2024, 59 (3) : 473-8. doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.03.016.
- [13] Deng S, Liu Y, Wang Y, et al. Progress in macrophage immune regulation of atherosclerosis [J]. *Am J Transl Res*, 2025, 17 (5) : 3261-75. doi: 10.62347/GMTC2479. eCollection 2025.

Integrated network pharmacology analysis and cellular evidence reveal the mechanisms of *Myristica fragrans* against atherosclerosis

Lu Shuxian¹, Zhou Zhiling¹, Zhang Yifeng¹, Yu Jun²

¹ *Jiangxi University of Chinese Medicine Medical Translation Center, Nanchang 330045;*

² *Lewis Katz School of Medicine at Temple University, Philadelphia, USA PA19140)*

Abstract *Objective* To explore the potential mechanisms by which *Myristica fragrans* prevents and treats atherosclerosis (AS). *Methods* The major active components of *Myristica fragrans* and their shared targets with AS were obtained from databases. The shared targets were subjected to pathway enrichment analysis and PPI network construction using the ClusterProfile package and the STRING database. Molecular docking between key targets and major active components was performed using AutoDock. Gene expression data from early and late, as well as stable and unstable AS plaques, were used to validate changes of key targets and major pathways during AS progression. Western blot, flow cytometry, YO-PRO-1/PI staining, and TUNEL staining were applied to verify the main mechanisms. *Results* Nine active components of *Myristica fragrans* interacted with 293 AS-related targets, among which eight components acted on an average of 57.0% of the shared targets. Gene ontology (GO) and Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) enrichment analyses indicated that the anti-AS effects mainly involved oxidative stress, inflammation, lipid metabolism, fluid shear stress, and apoptosis pathways. PPI network revealed *JUN*, *CASP3*, *MAPK3*, and *AKT1* as key targets mainly involved in regulating apoptosis. Molecular docking showed stable binding conformations and high affinities between major components and these targets. Integrated analysis of gene expression in early and late, as well as stable and unstable AS plaques, showed significant enrichment of leukocyte apoptosis pathways in late and unstable plaques. Cell experiments further confirmed that *Myristica fragrans* significantly reduced Cleaved-CASP3 ($P=0.04$) and p-MAPK3 ($P=0.0003$) levels, increased p-AKT1 ($P=0.004$) levels, and inhibited macrophage apoptosis. *Conclusion* *Myristica fragrans* potentially interferes with AS development by modulating pathways related to oxidative stress, inflammation, lipid metabolism, fluid shear stress, and apoptosis, with *CASP3*, *MAPK3*, and *AKT1* serving as key targets mediating its anti-apoptotic and anti-AS effects.

Key words *Myristica fragrans*; atherosclerosis; network pharmacology; molecular docking analysis; macrophage apoptosis

Fund programs Fund programs Special Fund for Science and Technology of Jiangxi Province (No. 20232BAB216012); College Student Innovation and Entrepreneurship Training Project of Jiangxi Province (No. S202310412091)

Corresponding authors Zhang Yifeng, E-mail: zyf489662913@163.com; Yu Jun, E-mail: jun.yu@temple.edu