

# 基于网络药理学及单细胞转录组学的芹菜素治疗动脉粥样硬化的作用机制探讨

幸丽姿<sup>1</sup>, 李雨虹<sup>2</sup>, 何佳<sup>1</sup>, 向靖文<sup>1</sup>, 杨筱瑶<sup>3\*</sup>, 李琦<sup>1\*</sup>

1. 哈尔滨医科大学附属肿瘤医院 生物治疗中心, 黑龙江 哈尔滨 150081

2. 中国人民武装警察部队黑龙江省总队医院 药剂科, 黑龙江 哈尔滨 150070

3. 黑龙江省医院 质量控制办公室, 黑龙江 哈尔滨 150036

**摘要:** **目的** 探讨芹菜素调控动脉粥样硬化的作用及其潜在作用靶点。**方法** 将 32 只 ApoE<sup>-/-</sup>小鼠随机分为对照组、模型组和芹菜素低、高剂量 (10、30 mg·kg<sup>-1</sup>) 组, 通过高胆固醇饲料喂养建立动脉粥样硬化模型。实验动物饲养 70 d 后, 分离各组实验动物血管 (主动脉根部至胸主动脉) 并进行油红 O 染色, 同时应用苏木精-伊红 (HE) 染色检测血管及主动脉瓣斑块。酶联免疫吸附 (ELISA) 法检测血清中总胆固醇 (TC)、三酰甘油 (TG)、高密度脂蛋白-胆固醇 (HDL-C) 和低密度脂蛋白-胆固醇 (LDL-C)。使用网络药理学方法筛选芹菜素的靶点, 并结合基因表达数据进行差异分析, 确定关键基因。通过单细胞转录组学分析关键基因在不同细胞类型中的表达, 并使用分子对接技术验证芹菜素与关键基因的结合活性。**结果** 与模型组相比, 芹菜素具有抑制血管壁脂质沉积和斑块形成的作用。高脂饲养条件下芹菜素具有抑制血浆脂质 (TC、TG、LDL-C 和 HDL-C) 水平升高的作用。生物信息学分析发现动脉粥样硬化时病变血管 FBP1 表达升高。分子对接发现 FBP1 与芹菜素之间存在较好的结合活性。芹菜素具有抑制病变血管 FBP1 表达的作用。**结论** 芹菜素抑制动脉粥样硬化作用机制与调控 FBP1 表达有关。

**关键词:** 动脉粥样硬化; 芹菜素; FBP1; 网络药理学; 转录组学

**中图分类号:** R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376(2025)08-2191-13

**DOI:** 10.7501/j.issn.1674-6376.2025.08.013

## Exploration of mechanism of apigenin in treatment of atherosclerosis based on network pharmacology and single-cell transcriptomics

XING Lizi<sup>1</sup>, LI Yuhong<sup>2</sup>, HE Jia<sup>1</sup>, XIANG Jingwen<sup>1</sup>, YANG Xiaoyao<sup>3</sup>, LI Qi<sup>1</sup>

1. Biotherapy Center, The Cancer Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150081, China

2. Pharmacy Department, Hospital of the Heilongjiang Provincial Corps of the People's Armed Police, Harbin 150070, China

3. Quality Control Office, Heilongjiang Provincial Hospital, Harbin 150036, China

**Abstract: Objective** This study aims to investigate the role of apigenin in regulating atherosclerosis and its potential targets. **Methods** A total of 32 ApoE<sup>-/-</sup> mice were randomly divided into four groups: control group, model group, apigenin low- and high- doses (10 30 mg·kg<sup>-1</sup>) group. An atherosclerosis model was established by feeding a high-cholesterol diet. After 70 d of feeding, the blood vessels (from the aortic root to the thoracic aorta) of the experimental animals were isolated for Oil Red O staining. Hematoxylin and eosin (HE) staining was used to detect vascular and aortic valve plaques. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was performed to measure serum total cholesterol (TC), triglycerides (TG), high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C), and low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C). Network pharmacology methods were used to screen the targets of apigenin, and differential analysis was conducted in conjunction with gene expression data to identify key genes. Single-cell transcriptomics analysis was performed to assess the expression of key genes in different cell types. **Results** Compared to the high-fat group, apigenin treatment inhibited lipid deposition in the vascular wall and plaque formation. Under high-fat feeding conditions, apigenin suppressed the increase in plasma

收稿日期: 2025-01-10

基金项目: 黑龙江省省属本科高校“优秀青年教师基础研究支持计划”(YQJH2023035); 海燕科研基金面上项目 (JJMS2022-16)

作者简介: 幸丽姿 (2001—), 硕士研究生在读。E-mail: 1057996519@qq.com

\*通信作者: 李琦, 博士, 副研究员, 硕士生导师, 主要从事免疫活化促血管疾病发生的机制研究。E-mail: li\_qi1986@126.com

杨筱瑶, 女, 博士, 副主任医师, 研究方向为药物临床试验和生物信息。E-mail: yangxiaoyao\_1987@163.com

lipid levels (CHO, TG, LDL-C, and HDL-C). Bioinformatics analysis revealed that the expression of FBP1 was elevated in the diseased vessels during atherosclerosis. Molecular docking indicated a good binding affinity between FBP1 and apigenin. Apigenin treatment was found to inhibit the expression of FBP1 in diseased vessels. **Conclusion** The inhibition of atherosclerosis by apigenin is associated with the regulation of FBP1 expression.

**Key words:** atherosclerosis; apigenin; FBP1; network pharmacology; transcriptomics

动脉粥样硬化 (AS) 是一种以血管脂质累积和斑块形成为特征的进行性炎症性血管病变<sup>[1-2]</sup>, 这一过程是由胆固醇的积累引起的, 主要以低密度脂蛋白-胆固醇 (LDL-C) 的形式存在于动脉内膜层中。这种积累的结果使动脉的延伸狭窄, 血流量急剧减少, 并导致组织缺氧的发展<sup>[3]</sup>。

目前针对 AS 的首选治疗药物是他汀类药物<sup>[4]</sup>, 但是大量的临床研究表明, 他汀类药物具有潜在的肝毒性<sup>[5]</sup>和骨骼肌相关<sup>[6]</sup>等不良反应。例如, 他汀类药物引发相关肌肉症状是最常见和最重要的不良反应, 高达 72% 的他汀类药物不良反应与肌肉有关, 在临床中表现为肌痛、肌病、肌酸激酶升高的肌炎, 或是严重的横纹肌溶解症<sup>[7]</sup>。因此, 探寻安全有效的新药物已成为 AS 治疗的重要研究方向。

芹菜素属于黄酮类化合物, 广泛存在于蔬菜、水果和豆类中。在其天然形式中, 芹菜素通常与体内的糖苷结合, 作为中药中的活性成分之一, 成为生物药剂开发领域的研究热点, 并被列为生物药剂分类系统中的 II 类药物<sup>[8]</sup>。从药理作用来看, 芹菜素被报道了多种药理学效应, 包括抗肿瘤<sup>[9]</sup>、抗氧化<sup>[10]</sup>、抗菌、抗病毒活性<sup>[11]</sup>和抗炎等<sup>[12]</sup>。例如, 最新研究发现, 芹菜素通过抑制 (干扰素基因刺激蛋白/干扰素调节因子 3) STING/IRF3 通路, 显著减弱了过度炎症的标志物, 如白细胞介素-6 (IL-6)、IL-1 $\beta$  和肿瘤坏死因子  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), 以及先天免疫反应 (如 IFN $\beta$ 1、CXCL10 和 ISG15) 的表达, 在体外和体内均表现出抑制炎症反应的作用, 从而改善了脂多糖诱导的炎症反应<sup>[13]</sup>。芹菜素在抗炎、抗氧化以及代谢调节方面具有显著作用, 有作为 AS 治疗药物的良好潜力, 但目前仍缺少确切的机制研究。本研究基于网络药理学及单细胞转录组学筛选芹菜素抗 AS 作用的相关靶点和通路, 并通过分子对接及动物实验进行初步验证, 为芹菜素临床治疗 AS 提供理论依据。

## 1 材料

### 1.1 实验动物

C57BL/6J 遗传背景的载脂蛋白 E 基因敲除小鼠 (ApoE<sup>-/-</sup>) 购自南京君科生物工程有限公司, 雄

性, 清洁级, 8 周龄, 体质量 (22 $\pm$ 2) g, 生产许可证号: SCXK (苏) 2022-0009。实验动物饲养于哈尔滨医科大学药理学实验动物中心。本实验通过哈尔滨医科大学附属肿瘤医院伦理委员会批准 (KY2016-16)。

### 1.2 药物与试剂

芹菜素 (ACat#520-36-5, 质量分数 98.03%, 批号 GL20211223) 购自成都瑞芬思德丹生物科技有限公司。总胆固醇 (TC, Cat#A111-1-1), 三酰甘油 (TG, Cat#A110-1-1), 高密度脂蛋白-胆固醇 (HDL-C, Cat#A112-1-1) 和 LDL-C (Cat#A113-1-1) 均购自南京建成科技有限公司, 批号 20221089、20221019、20221322、20221354。高脂饲料购自北京科澳协力饲料有限公司 (蔗糖 20%、猪油 15%、胆固醇 1.2%、胆酸钠 0.2%、酪蛋白 10%、磷酸氢钙 0.6%、石粉 0.4%、预混料 0.4%、基础饲料 52.2%)。

### 1.3 仪器

TS100 倒置显微镜 (日本尼康公司); Mini-6K 低速离心机 (中国奥盛仪器有限公司); DS-3D100 水平摇床 (北京恒奥生物科技有限公司); Synergy H1 型多功能酶标仪 (美国 BioTek)。

## 2 方法

### 2.1 动物建模及分组

32 只 ApoE<sup>-/-</sup>小鼠随机分成 4 组, 对照组 (普通饲料喂养)、模型组、芹菜素低、高剂量 (10、30 mg $\cdot$ kg<sup>-1</sup>) 组, 除对照组外, 连续喂养 35 d 高脂饲料建立高脂模型。35 d 后, ip 给予不同浓度芹菜素至 70 d, 使用二氧化碳过量麻醉法处死小鼠, 快速分离动脉 (包括左右颈总动脉、左锁骨下动脉、主动脉至腹主动脉)。

### 2.2 苏木素-伊红 (HE) 染色

将小鼠的血管和心脏分离后, 快速将组织置于 4% 的多聚甲醛固定液中固定 24 h。组织包埋切片, HE 染色: 二甲苯 I 10 min、二甲苯 II 10 min、95% 乙醇 I 3 min、95% 乙醇 II 3 min、75% 乙醇 I 3 min、75% 乙醇 II 3 min、苏木素染色 3 min、流水洗去苏木素 15 min、伊红染色 3 min、80% 乙醇 15 s、95% 乙醇 I 1 min、95% 乙醇 II 1 min、无水乙醇 I 10 min、无水

乙醇II 10 min、二甲苯I 3 min、二甲苯II 3 min、中性树胶封片。在显微镜下检查拍照，观察。

### 2.3 油红 O 染色

将配好的油红 O 染色液盛放在小皿中，动脉完全浸泡在染色液里，置于水平摇床染色 20~30 min。染色完成后用眼科镊小心将动脉取出，用 75%酒精冲洗并将残留的染液洗净，冲洗时力度要轻，避免损伤动脉内膜。将主动脉沿中轴线剪开，平铺于载玻片上进行拍照，动脉内膜被红染的区域则为脂质沉积区域。使用倒置显微镜拍照并用 Image-Pro Plus 软件分析油红 O 染色照片，计算阳性染色区域占整体动脉区域或细胞总面积的百分比，即代表动脉脂质沉积和巨噬细胞脂质蓄积的严重程度。

### 2.4 ELISA

将小鼠禁食 12 h，取血至采血管中，1 000 r·min<sup>-1</sup>离心 15 min 后吸上清。将血浆等比稀释成 5 个浓度梯度，检测样品最佳测定浓度，根据说明书，取空白 96 孔板，设置好空白孔、标准孔、样本孔，37 °C 孵育 10 min，于酶标仪上测定 510 nm 波长的吸光度，根据说明书上相应的公式换算血清脂质浓度，单位为 mmol·L<sup>-1</sup>。

### 2.5 实时荧光定量 PCR 法 (qRT-PCR)

取适量血管组织于 EP 管中，每管加入 200 μL TRIzol 试剂，将 EP 管置于冰上，用研磨棒研磨组织至匀浆后，冰上裂解 10 min。13 500 r·min<sup>-1</sup>、4 °C 离心 15 min。向 EP 管中加入 200 μL 氯仿萃取，剧烈震荡 15 s，室温放置 30 min。4 °C、13 500 r·min<sup>-1</sup>离心 15 min。吸取离心后的上层液体于新的 EP 管中，加入等体积异丙醇，吹打混匀，冰上静置 30 min 后。4 °C、13 500 r·min<sup>-1</sup>离心 15 min，弃掉上清液后可观察到离心管底部有羽毛状沉淀，用滤纸条吸干管壁液体，加入 75%乙醇溶解 RNA 后，4 °C、10 600 r·min<sup>-1</sup>离心 5 min 后，弃掉上清液，待干燥。加入 DEPC 水溶解 RNANano Drop 8000 检测 RNA 纯度及浓度并进行后续实验。

根据 ReverTra Ace qPCR-RT 试剂盒说明书进行逆转录，反应程序设为：42 °C 15 min；85 °C 5 min；4 °C 无限循环。以逆转录获得的 cDNA 为模板，对小鼠血管中 FBP1 及 GAPDH 引物进行基因扩增。反应条件：95 °C，5 min；95 °C，10 s；55 °C，15 s；72 °C，20 s。采用 2<sup>-ΔΔCt</sup> 法计算基因相对表达量。引物序列见表 1。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequence

基因	前项 (5'→3')	后项 (5'→3')
FBP1	GAAGCCTCTCATCTT ATGGCATT	CCTCATCACCTGACT CCACAA
GAPDH	GAGTCCACTGGCGTC TTCAC	ATCTTGAGGCTGTTG TCATA CTTCT

### 2.6 芹菜素靶点的获得

从公共数据库 GEO 数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo>) 下载 GEO 数据集，包括 AS 组织的基因芯片数据集 GSE100927<sup>[14]</sup> 和单细胞转录测序数据集 GSE159677<sup>[15]</sup>；药物靶点以 SwissADME (<http://www.swisstargetprediction.ch/>) 为来源的 101 个，以 TCMSP (<https://old.tcmsp-e.com/tcmsp.php>) 为来源的 81 个；以 CTD (<https://ctdbase.org/>) 为来源的共 339 个，合并去除重复靶点后共得到 495 个。

### 2.7 批量转录组测序筛选 AS 差异基因

**2.7.1 差异分析** 使用 R 软件 (4.3.3 版本，下同) “limma-voom” 包对标准化后 mRNA 表达数据进行差异表达分析，设定阈值：|log<sub>2</sub>FC| ≥ 1, P < 0.05，筛选 AS 组与正常对照组中差异表达基因。

**2.7.2 加权基因共表达网络分析 (WGCNA)** 使用 “WGCNA” 包对数据集 GSE100927 进行 WGCNA。首先，筛选出择绝对中位差 (MAD) 最高的前 5 000 个基因，并利用函数 “pickSoftThreshold” 确定合适的软阈值。然后使用函数 “blockwiseModules” 构建拓扑重叠矩阵 (TOM) 的聚类树结构。读取表型数据，并与模块特征 (MEs) 进行关联分析，识别出与 AS 最相关的模块特征基因。

**2.7.3 机器学习分析** 利用 Venn 包取差异基因、药物靶点及模块特征基因 (青绿色、洋红色和蓝色模块) 的重叠基因。使用 “glmnet” 函数拟合 LASSO 模型，并绘制 LASSO 回归曲线图，进行 10 折交叉验证，均方误差最小的对数 λ 值，绘制交叉验证结果图并提取特征基因。使用 “SVM-REF” 函数进行特征选择，采用 5 折交叉验证，用 “Venn” 包可视化重叠特征基因。使用 “randomForest” 包构建随机森林模型，以分析基因表达数据与分类特征之间的关系，构建随机森林模型 (mtry=2, ntree=500, replace=TRUE, nodesize=1, maxnodes=NULL)，并计算变量的重要性评分，使用基尼系数方法评估各基因对分类结果的影响。

## 2.8 单细胞转录组测序筛选 AS 关键靶点

**2.8.1 数据导入与预处理** 使用 Read10X 函数读取 10X Genomics 格式的单细胞 RNA 测序数据，并用“Seurat”包<sup>[16]</sup>创建对象。然后进行质量控制，过滤条件要求每个细胞至少表达 200 个基因，至多表达 25 000 个基因，且每个细胞的线粒体基因表达比例小于 15%，减少低质量细胞和双细胞等对结果的影响。使用“NormalizeData”函数进行数据标准化和“FindVariableFeatures”识别出 2 000 个高变基因后续分析。

**2.8.2 降维聚类及细胞注释** 使用“ScaleData”函数缩放所有函数，主成分分析法 (PCA) 进行降维，选取 1 到 20 的维度。通过“FindNeighbors”和“FindClusters”函数进行细胞聚类分析，最后采用 TSNE 方法对单细胞群聚类结果作可视化分析，根据各个细胞群的特征基因进行手动注释。

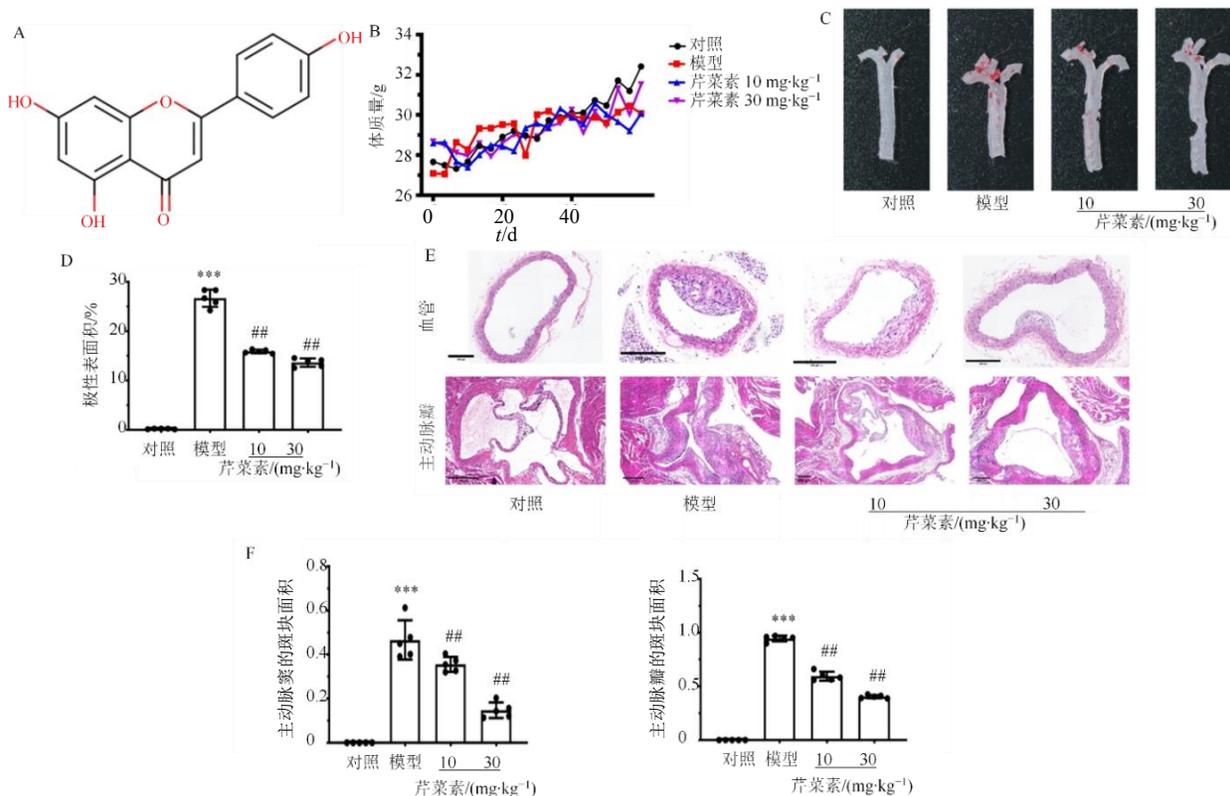
**2.8.3 基因本体 (GO) 注释及京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 通路富集分析** 使用“ClusterProfiler”包采用 GO 功能进行富集分析。基于“createKEGGdb”工具构建本地化 KEGG 数据库，通过 enrichKEGG 函数对输入基因 (ENTREZ ID 格式) 进行通路富集分析。

## 2.9 分子对接验证

从 PDB 数据库 (<https://www.rcsb.org/>) 下载关键靶点的蛋白结构，使用 AutoDock Vina 软件进行分子对接，Exhaustiveness 值为 32，每个靶点对接 9 次。对接结果使用 Pymol 软件进行可视化分析。

## 2.10 统计分析

本研究所有数据处理及统计分析在 R4.3.3 软件和 GraphPad Prism9 中进行。所涉及的统计分析方法主要包括 Wilcoxon 秩和检验和方差检验 (ANOVA) 分析， $P < 0.05$  表示分析具有统计学意义。



A-芹菜素的分子结构; B-小鼠体质量变化; C-升主动脉分叉处 AS 斑块油红 O 染色代表性图像; D-油红 O 染色斑块面积统计分析; E-血管脂质沉积及主动脉瓣脂质沉积 HE 染色代表性图像; F-血管及主动脉瓣斑块面积统计分析; 与对照组相比: \*\*\* $P < 0.001$ ; 与模型组相比: \*\* $P < 0.01$ 。

A-Molecular structure of apigenin; B-Body weight changes in each group of mice; C-Representative images of oil red O staining of atherosclerotic plaques in the ascending aorta bifurcation of each group; D-Statistical analysis of the area of oil red O-stained atherosclerotic plaques; E-Representative images of HE staining assessing vascular lipid deposition and aortic valve in each group; F-Statistical analysis of plaque area in the aortic sinus and aortic valve of each group; \*\*\* $P < 0.001$  vs control group; \*\* $P < 0.01$  vs model group.

图 1 芹菜素抑制高脂饮食喂养 ApoE<sup>-/-</sup>小鼠 AS 斑块形成 ( $\bar{x} \pm s, n=5, \times 40$ )

Fig. 1 Apigenin inhibits AS plaque formation in HFD-Fed ApoE<sup>-/-</sup> mice ( $\bar{x} \pm s, n=5, \times 40$ )

### 3 结果

#### 3.1 芹菜素抑制 ApoE<sup>-/-</sup>小鼠 AS 斑块形成

ApoE<sup>-/-</sup>小鼠高脂饲养 35 d 后, ip 给予不同剂量芹菜素 (图 1-A), 70 d 后检测发现高脂饲养条件下给予不同剂量芹菜素对于实验动物的体质量没有影响 (图 1-B)。油红 O 结果提示, 与模型组比较, 高脂饲养条件下 10、30 mg·kg<sup>-1</sup> 芹菜素均具有明显抑制血管壁脂质沉积的作用 (图 1-C、D), 且 30 mg·kg<sup>-1</sup> 芹菜素组的血管壁脂质沉积明显少于 10 mg·kg<sup>-1</sup> 芹菜素组。

血管斑块的面积占比是 AS 病变进展的重要评估指标。为了评估芹菜素对高脂饲养的 ApoE<sup>-/-</sup>小鼠颈总动脉血管及主动脉瓣血管斑块的影响, 随后通过 HE 染色进一步证实, 芹菜素可抑制由高脂饲养所引起的血管及主动脉瓣斑块形成 (图 1-E、F)。

而且高剂量芹菜素抑制斑块形成的作用要优于低剂量芹菜素。

上述结果说明芹菜素具有抑制高脂诱发的血管斑块形成作用, 且芹菜素抑制斑块形成的作用呈浓度相关性。

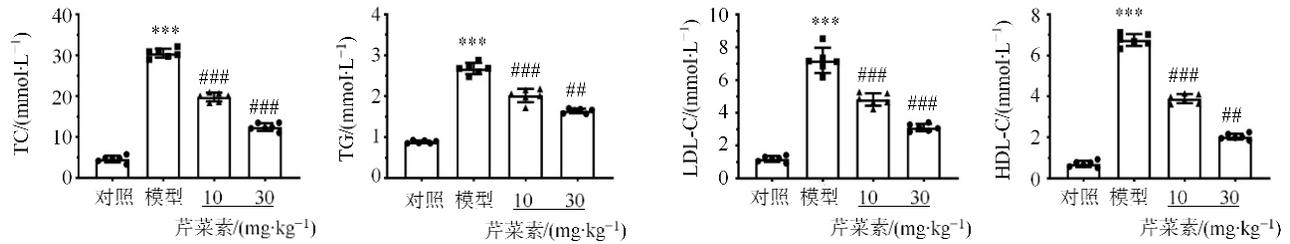
#### 3.2 芹菜素抑制 ApoE<sup>-/-</sup>小鼠血浆脂质升高

血清脂质含量检测发现, 与对照组比较, ApoE<sup>-/-</sup>小鼠高脂饲养后血清 TC、TG、LDL-C、HDL-C 显著升高。而芹菜素可以明显抑制高脂饲养条件下 ApoE<sup>-/-</sup>小鼠血浆 TC、TG、LDL-C 和 HDL-C 升高 (图 2)。

#### 3.3 芹菜素靶点筛选与批量转录组分析

生信分析流程见图 3。

**3.3.1 筛选芹菜素靶点** 通过 TCMSP、SwissTargetPrediction、pharmmapper 与 CTD (数据库检索, 获得共 495 个芹菜素靶点。



与对照组比较: \*\*\* $P < 0.001$ ; 与模型组比较: ## $P < 0.01$  ### $P < 0.001$ 。

\*\*\* $P < 0.001$  vs control group; ## $P < 0.01$  ### $P < 0.001$  vs model group.

图 2 芹菜素降低高脂诱导 ApoE<sup>-/-</sup>小鼠血脂水平 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=6$ )

Fig. 2 Apigenin reduces blood lipid levels in HFD-induced ApoE<sup>-/-</sup> mice ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=6$ )

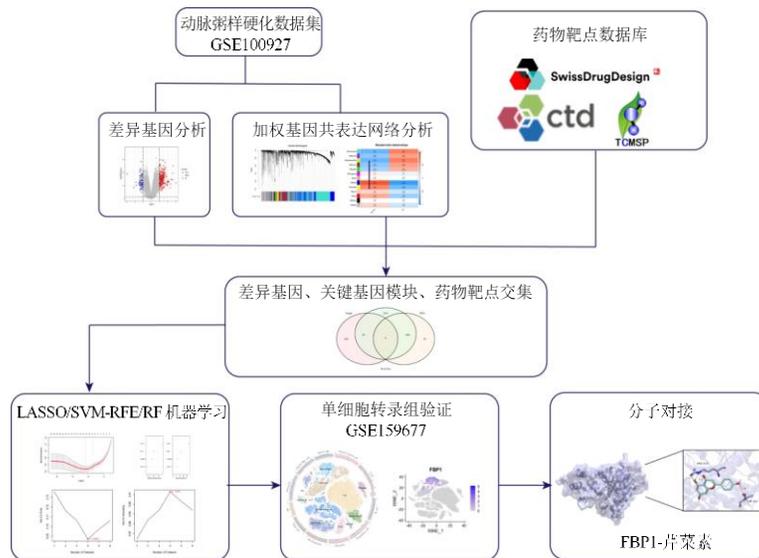


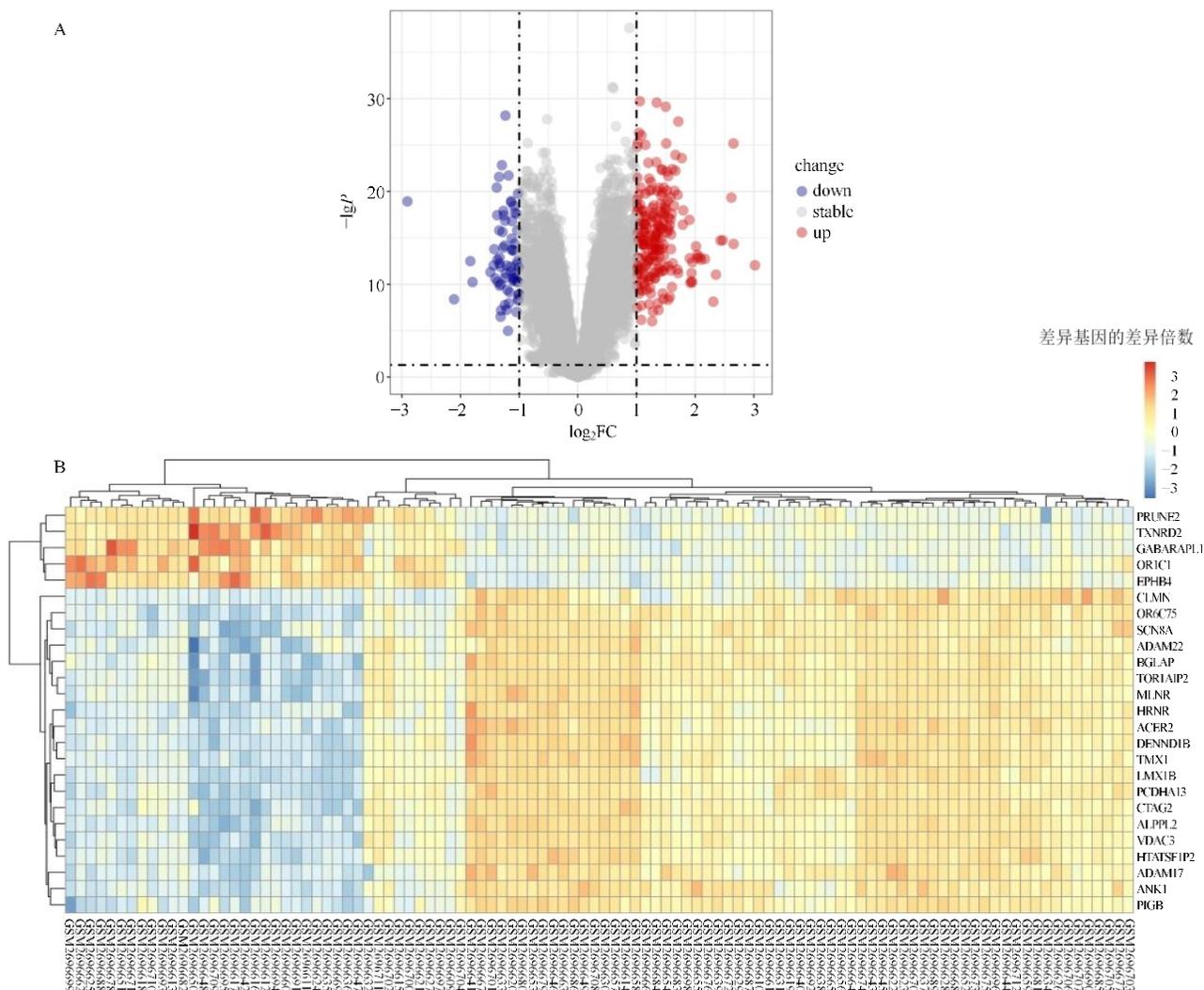
图 3 芹菜素靶点筛选和验证流程图

Fig. 3 Flow chart of apigenin target screening and validation

**3.3.2 AS 中差异基因分析** 下载 AS 动脉微阵列数据的标准化表达矩阵 (GSE100927), 使用数据集中注释文件对探针进行基因名注释, 其中包含 65 个 AS 组和 35 个对照组。使用 limma 包对数据集进行

差异分析, 共鉴定出 311 个差异基因 (DEGs), AS 组中 242 个基因上调, 69 个基因下调 ( $|\log_2FC| \geq 1, P < 0.05$ )。见图 4。

**3.3.3 WGCNA** 通过建立基因间的相关性, 将所



A-GSE100927 数据集差异表达基因热图; B-GSE100927 数据集差异表达基因火山图。  
A-Heatmap of DEGs in GSE100927; B-Volcano plot of DEGs in GSE100927.

图 4 AS 样本与正常样本差异表达基因分析

Fig. 4 Differentially expressed genes between AS and normal samples

有基因分成不同的模块。同一模块中的基因被认为具有相似的表达变化。为了确保后续 WGCNA 的数据质量, 对基因表达矩阵进行了异常样本和基因的过滤。随后, 统计了过滤后数据矩阵中的样本数量和基因数量, 并通过层次聚类分析对样本进行进一步的质量评估。基于欧几里得距离计算样本间的距离矩阵, 并采用平均连接法进行聚类分析。

在 WGCNA 中, 首先通过建立基因间的相关性, 利用基因表达矩阵将所有基因分成不同的模块。为

了确保后续分析的数据质量, 对基因表达矩阵进行了系统的异常样本和基因过滤。在过滤后, 统计了数据矩阵中的样本数量和基因数量, 并通过层次聚类分析对样本进行了进一步的质量评估。基于欧几里得距离计算样本间的距离矩阵, 并使用平均连接法进行聚类分析, 确保了样本的合理性和可靠性。

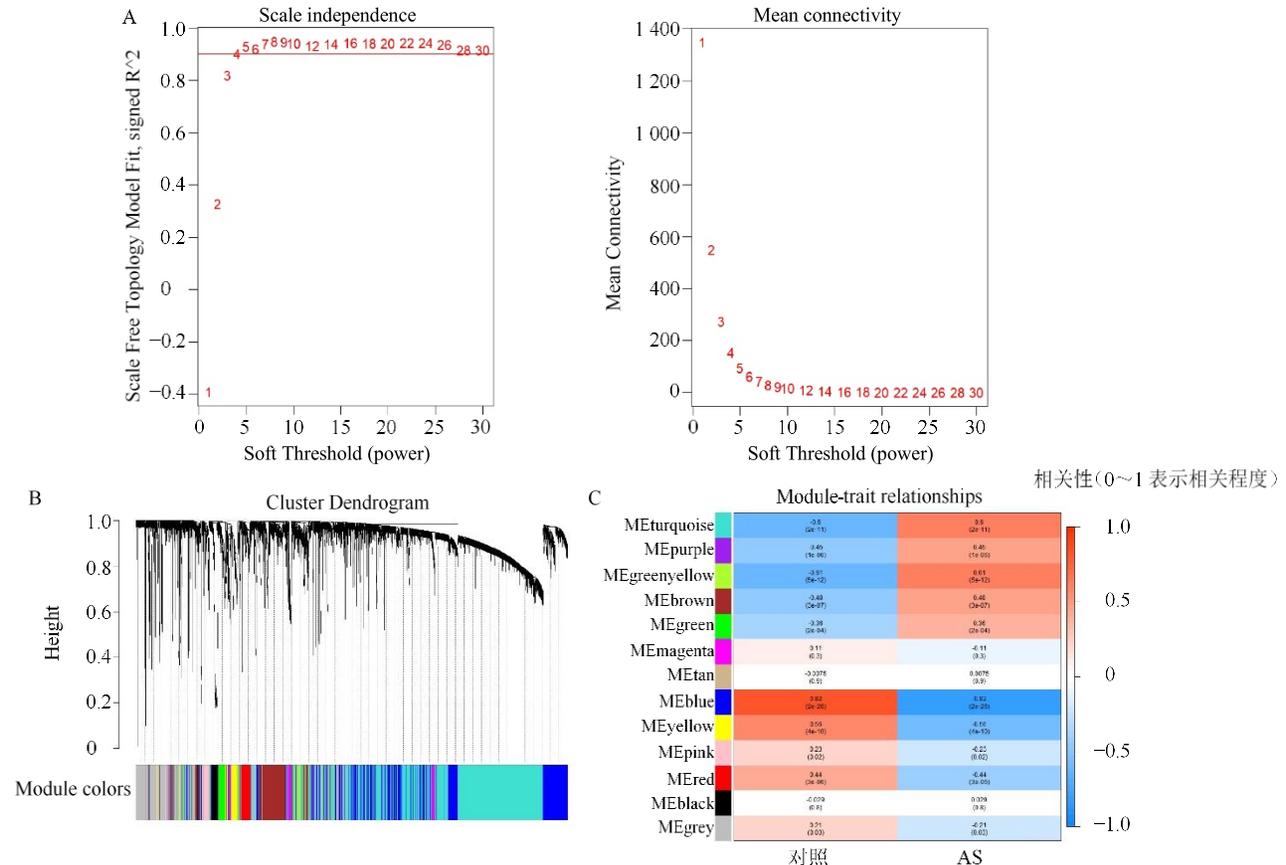
根据尺度独立性和平均连接性, 选择了  $\beta=9$  作为软阈值 (图 5-A), 以此为基础共生成了 11 个基因共表达模块 (图 5-B)。模块划分的依据主要是在

相似的表达模式下将基因分组，这意味着同一模块中的基因在功能上可能存在相似性或参与相同的生物过程。

合性状进行相关性分析后，发现青绿色、蓝色、洋红色模块与 AS 表现出高度相关性（相关系数  $> 0.6$ ,  $P < 0.001$ ）（图 5-C）。值得注意的是，青绿色模块与洋红色模块在表达上显示出正向相关性，可

能提示这 2 个模块在相似的生物通路或功能上存在冗余或协同作用；而蓝色模块则表现出负相关性，这可能反映出其在 AS 发生中的抑制作用或对疾病进程的相反影响。

最终，3 个关键模块（青绿色、蓝色和洋红色）被视为后续分析的关键模块，合并后共包含 3 166 个基因，这些基因可能与 AS 的发病机制密切相关。



A-尺度独立性分析及平均连接性分析；B-聚类树状图；C-AS 与基因模块相关性热图。

A-Selection of soft threshold; B-Clustering dendrogram; C-Heatmap showing the correlation and p-values between modules and atherosclerosis.

图 5 加权基因共表达和特征模块识别

Fig. 5 WGCNA analysis and feature module identification

### 3.4 关键基因筛选

495 个靶点、311 个 DEGs 和 3 166 个 WGCNA 基因之间有 6 个重叠基因，这 6 个基因被认为是候选关键基因（图 6-A）。

进一步筛选上述 6 个重叠基因，分别采用 Lasso 回归、支持向量机（SVM-REF）和随机森林（RF）算法进行分析。首先，在 Lasso 回归分析中使用了 L1 正则化方法，有效地进行特征选择，同时避免过拟合。模型的交叉验证过程采用了 10 折交叉验证，评估指标为模型的偏差，以确定最优的正则化参数。最终回归模型中筛选出了 5 个具有非零系数的

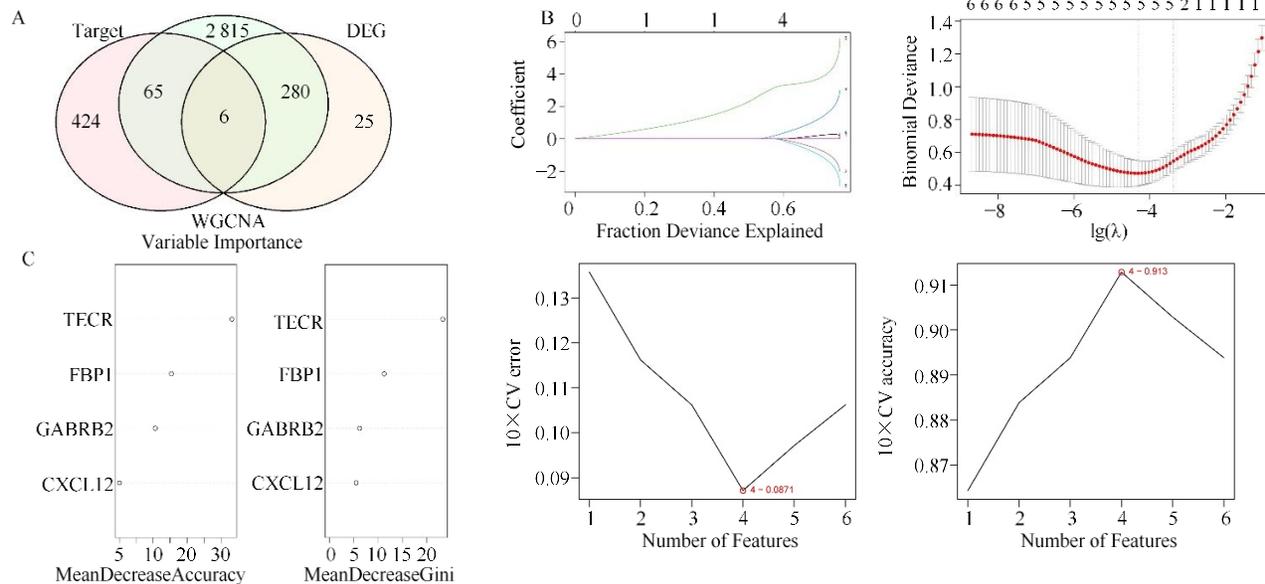
特征基因。

随后使用 SVM-REF 分析，在特征递归消除的过程中，通过设定  $halve.above=100$ ，在特征数量超过 100 时，每次递归消除一半的特征，以提高计算效率。交叉验证过程采用了五折交叉验证，系统地评估模型在不同特征数量下的性能。通过绘制误差率和准确率曲线，发现当特征数量为 4 时，模型的误差率达到最小值，同时准确率也显著提高。模型选出了反式-2,3-烯酰辅酶 A 还原酶（TECR）、果糖-二磷酸酶 1（FBP1）、 $\gamma$ -氨基丁酸 A 型受体亚基  $\beta 2$ （GAGRB2）和 C-X-C 基序趋化因子配体 12

(CXCL12) 4 个基因, 这些基因对疾病表型的分类表现最为关键 (图 6-B)。

为了进一步评估 4 个重叠基因 (CXCL12、FBP1、GABRB2、TECR) 对疾病表型的贡献, 采用

随机森林算法, 对其参数设置和分析过程进行了系统性的优化。通过 10 折交叉验证评估模型性能, 结果显示模型表现出良好的稳定性和准确性并计算基因重要性评分 (图 6-C)。



A-韦恩图筛选关键基因; B-Lasso 回归和 SVM-RFE; C-随机森林计算基因重要性。

A-Venn diagram for screening key genes; B-Lasso and SVM-RFE for overlapping genes; C-Variable importance calculation using random forest.

图 6 机器学习筛选关键基因

Fig. 6 Machine learning for screening key genes

### 3.5 单细胞转录组数据集及体外实验中关键基因的表达

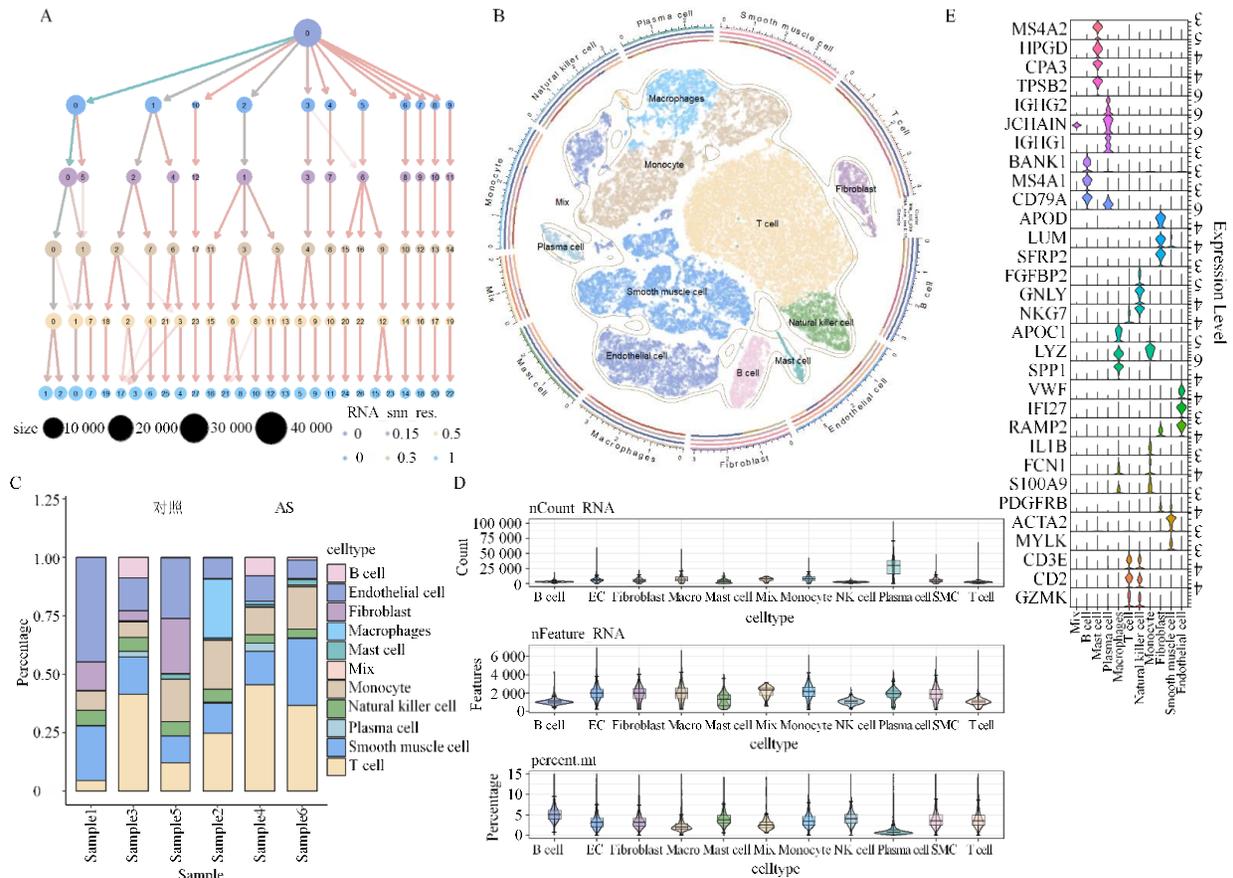
**3.5.1 细胞聚类及注释** 从数据集 GSE159677 获取 6 个样本的测序数据, 包括 3 个 AS 样本和 3 个正常邻近区域。通过去除低质量细胞及双细胞等质控手段 (图 7-D), 共获得来自 6 个样本, 48 279 个细胞的转录组数据。根据不同种类细胞的差异基因和特异性标志物 (图 7-E) 和聚类树状图 (图 7-A), 将细胞分为 11 个细胞群并注释, 包括 T 细胞、平滑肌细胞、单核细胞、内皮细胞、巨噬细胞、自然杀伤细胞、成纤维细胞、B 细胞、浆细胞、肥大细胞和混合细胞群 (图 7-B), 并展示了不同样本中的细胞比例 (图 7-C)。

**3.5.2 关键基因表达分布及表达量** *FBP1* 在巨噬细胞群中聚集表达, *CXCL12* 在上皮细胞以及平滑肌细胞中聚集表达, 而 *TECR* 和 *GAGRB2* 无显著聚集表达趋势 (图 8)。与对照组相比, 巨噬细胞中 *FBP1* 在 AS 组表达显著升高 ( $P < 0.01$ ), 平滑肌细胞中 *CXCL12* 在 AS 组显著升高 ( $P < 0.001$ ), 全细

胞中 *TECR* 在对照组显著升高 ( $P < 0.001$ )。

**3.5.3 对 FBP1 表达差异的细胞进行富集分析** 将有高 *FBP1* 表达和不表达 *FBP1* 的巨噬细胞进行差异分析, 通过结合基因表达数据与 KEGG 通路富集分析和 GO 功能富集分析, 进一步揭示 *FBP1* 与巨噬细胞代谢和信号通路相关的多个潜在靶点, 这些通路在 AS 的发展中可能发挥关键作用 (图 9)。富集分析结果显示, *FBP1* 高低表达的巨噬细胞显著富集在糖酵解/肝糖生成、单糖代谢过程和六碳糖代谢过程中。这些代谢通路与细胞代谢状态密切相关, 而巨噬细胞的代谢重编程 (如糖酵解增强) 被认为是其促炎表型的重要特征<sup>[17]</sup>; 其次, 在富集分析中, 胆固醇代谢和曲丁酸与二羧酸代谢等通路表明 *FBP1* 可能在脂质代谢中发挥重要作用; 最后, 高表达 *FBP1* 的巨噬细胞显著富集在 IL-17 信号通路和 NLRP3 炎症小体相关通路中。

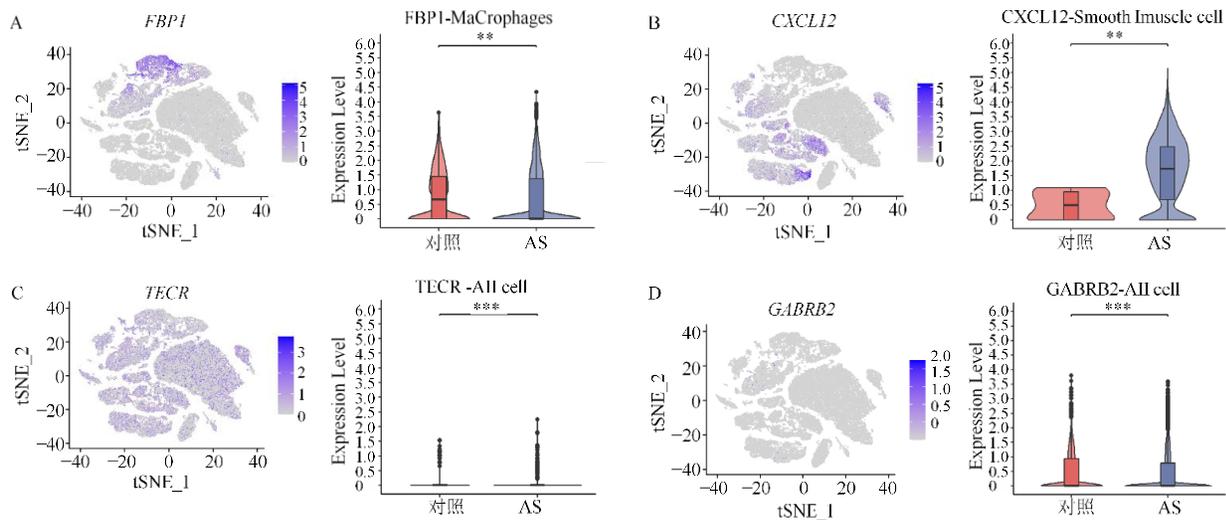
结果显示, *FBP1* 通过糖代谢与炎症调控、脂质代谢与斑块形成的调控和炎症信号通路的调控对在巨噬细胞的炎症反应和功能失调起作用。



A-不同分辨率下的聚类树图; B-主要细胞类型的降维聚类 t-SNE 图; C-样本中的细胞比例图; D-细胞质控图; E-细胞标志基因图。  
A-Clustering dendrogram at different resolutions; B-t-SNE plot for major cell types; C-Cell proportion in samples; D-Cell quality control plot; E-Cell marker gene plot.

图 7 单细胞转录组聚类、质控及标志基因

Fig. 7 Single-cell transcriptome clustering, quality control, and marker genes

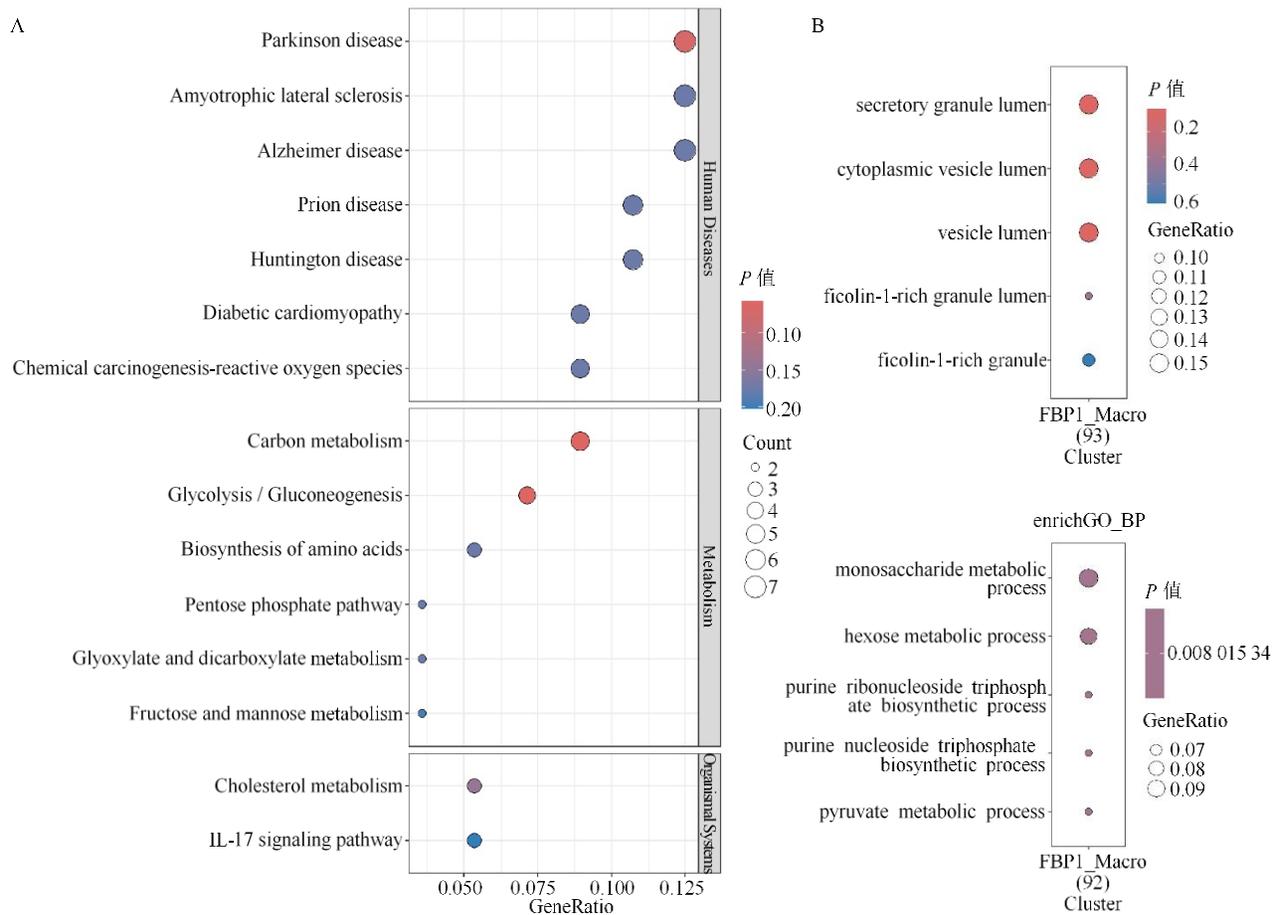


A-巨噬细胞中 *FBP1* 的表达水平; B-平滑肌细胞中 *CXCL12* 的表达水平; C-所有细胞中 *TECR* 的表达水平; D-所有细胞中 *GABRB2* 的表达水平; 与对照组相比: \*\* $P < 0.01$  \*\*\* $P < 0.001$ 。

A-Expression level of *FBP1* in macrophages; B-Expression level of *CXCL12* in smooth muscle cells; C-Expression level of *TECR* in all cells; D-Expression level of *GABRB2* in all cells; \*\* $P < 0.01$  \*\*\* $P < 0.001$  vs control group.

图 8 关键基因的表达分布及表达水平

Fig. 8 Expression distribution and expression levels of key genes



A-KEGG 富集分析; B-GO 富集分析。  
A-KEGG enrichment analysis; B-GO enrichment analysis.

图 9 FBP1 阳性巨噬细胞簇的功能富集分析

Fig. 9 Functional enrichment analysis for FBP1 positive macrophage clusters

### 3.6 关键靶点与芹菜素的分子对接

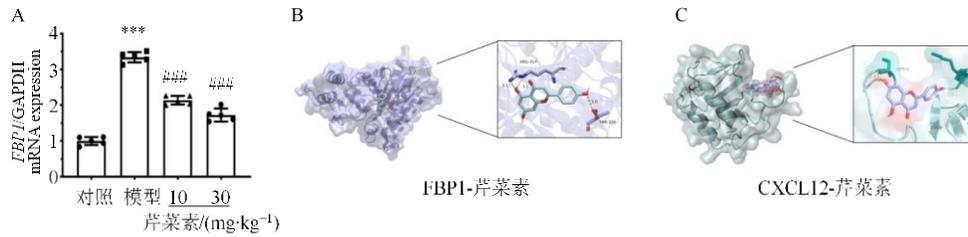
在晚期 AS 病变中, 普遍存在促炎巨噬细胞经历代谢重编程, 其特征是糖酵解增强、戊糖磷酸途径 (PPP) 激活等<sup>[18]</sup>, 而有研究指出 FBP1 的升高很可能通过提供代谢底物或调控代谢通路, 促进 PPP 的活性, 从而支持巨噬细胞的高代谢状态和炎症反应<sup>[19]</sup>, 所以 FBP1 或是推动 AS 病程发展的关键节点。选择 FBP1 作为关键靶点进行 qPCR 表达验证, 并进行下一步分析 (图 10-A)。

同时, CXCL12 是作为一种特异性趋化因子配体, 在细胞趋化中起重要作用。目前 CXCL12 被广泛认可通过 CXCL12/CXCR4/ACKR3 轴发挥促 AS 作用, 主要机制包括参与了血脂紊乱、血管生成、斑块不稳定、血栓形成、新生内膜增生和对血管内皮的促炎作用等<sup>[20-22]</sup>, 也是潜在的治疗靶点。为了进一步验证关键靶点和小分子化合物之间的关系,

使用 PDB 数据库检索得到靶点及对应 PDBID 为 FBP1 (5Q09)、CXCL12 (2J7Z), 使用 AutoDock Vina 将上述关键靶点与芹菜素进行分子对接。通常认为最低结合能均小于  $-17.8 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ , 表示配体与受体均可进行自发结合, 小于  $-20.9 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$  表示有较好的结合活性<sup>[23]</sup>。结果显示, 芹菜素与 FBP1 的平均结合能为  $-25.9 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ , 与 CXCL12 的平均结合能为  $-26.8 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ , 均有较好的结合活性。且蛋白质与小分子间可能存在氢键连接等分子间作用力, 利用 PyMOL 软件将结果进行可视化 (图 10-B、C)。

### 4 讨论

AS 是血管疾病中最常见的病理改变。而由血管斑块破裂所引起的急性心肌梗死是导致患者急性死亡的重要原因<sup>[24]</sup>。本研究发现芹菜素具有明显抗 AS 的作用。提示芹菜素可作为治疗 AS 的潜在候选治疗药物。



A-不同组中 *FBPI* 的 mRNA 水平,  $n=6$ ; B-*FBPI* 与芹菜素的对接结果; C-*CXCL12* 与芹菜素的对接结果。

A-mRNA levels of *FBPI* in different group,  $n=6$ ; B-Docking results of *FBPI* with apigenin; C-Docking results of *CXCL12* with apigenin.

图 10 关键靶点与芹菜素的分子对接

Fig. 10 Molecular docking of key targets with apigenin

AS 常伴有明显血管脂质累计和血管斑块形成。本研究显示芹菜素能够显著减少  $APoE^{-/-}$  小鼠高脂饲养条件下的血管脂质沉积和血管斑块形成, 考虑到脂质沉积和斑块形成与血浆脂质含量改变密切相关<sup>[25]</sup>。进一步检测了血浆脂质含量的变化。结果同样发现芹菜素具有很好地调血脂作用。综合已有研究结果, 认为芹菜素具有潜在的抗 AS 的作用。

通过以上实验以及对已有文献可以合理推测芹菜素由多靶点机制共同抑制 AS 斑块的形成, 其作用主要体现在以下 4 个方面: 首先是抗炎, 芹菜素通过抑制炎症小体的组装和炎症因子的释放, 显著降低斑块内炎症因子的表达<sup>[26]</sup>。同时, 芹菜素通过阻断 *STING/IRF3* 信号通路, 抑制促炎因子 (如 *TNF- $\alpha$* 、*IL-6*) 的释放, 从而进一步缓解动脉壁的炎症损伤<sup>[13]</sup>。其次是调节脂质代谢。研究发现芹菜素还具有激活肝脏 X 受体  $\alpha$  (*LXR $\alpha$* ), 进而增强 *ABCA1* 介导的胆固醇外排, 最终减少泡沫细胞形成的作用<sup>[28]</sup>。此外, 芹菜素能够阻断 *SREBP-2* 的核转位, 抑制胆固醇合成的关键酶 (如 *HMG-CoA* 还原酶) 的表达, 这可能是其调节脂质代谢的另一重要机制<sup>[29]</sup>; 第三调控免疫细胞的功能。芹菜素可以下调巨噬细胞中的 *FBPI* 表达, 这也就提示芹菜素可能通过抑制戊糖磷酸途径 (PPP), 从而减少炎症性巨噬细胞的代谢重编程<sup>[18-19]</sup>。

虽然证实芹菜素可以抑制 AS 进展, 但是其关键的靶点蛋白不清楚, 为此通过网络药理学的方法筛选出 495 个芹菜素的作用靶点, 进一步通过转录组学数据和 *WGCNA* (*WGCNA*), 识别并筛选出 6 个关键候选基因。最后再通过单细胞转录组学的方式进一步确定 *FBPI* 是芹菜素作用的关键靶点。

研究发现 *FBPI* 是参与糖代谢的关键代谢酶。其在巨噬细胞中的异常表达通过增强糖酵解和 PPP 来进而促进巨噬细胞参与炎症反应<sup>[18]</sup>。随后通过富

集分析发现巨噬细胞中 *FBPI* 通过糖代谢在炎症调控、脂质代谢与斑块形成的调控中起重要作用。在糖代谢层面, 推测糖酵解的增强为炎症性巨噬细胞提供能量和代谢中间产物, 促进炎症因子的分泌。在脂质代谢调节上, *FBPI* 的低表达可能通过调节脂质代谢相关酶的活性, 减少泡沫细胞的形成。

尽管研究发现芹菜素具有抗 AS 的作用; *FBPI* 是芹菜素潜在的作用靶点。但是本研究仍然存在不足和局限性, 筛选出 *FBPI* 作为芹菜素的作用靶点后, 但没有进一步验证二者之间的关联。因此在后续的实验中将进一步探讨芹菜素调控 *FBPI* 表达的分子机制。

另外, 本实验发现  $APoE^{-/-}$  小鼠高脂饲养后外周血 *HDL-C* 含量明显升高, 提示高脂饲养条件下具有诱发机体 *HDL-C* 含量升高的作用。目前有研究报告 *HDL-C* 功能结构的改变会导致 *HDL-C* 原有抗动脉粥样硬化功能的丧失<sup>[30-31]</sup>。结合本实验的结果, 推测外周血中存在的高浓度 *HDL-c* 并不具有抗动脉粥样硬化的作用, 相反, 这种高浓度 *HDL-C* 可能是诱发或促进动脉粥样硬化的关键。但 *HDL-C* 具体作用仍需深入研究。

本研究通过整合网络药理学、转录组学和动物实验, 系统证实了芹菜素具有抗 AS 的作用, 揭示了芹菜素抗 AS 的多靶点机制, 其天然来源和高安全性为开发新型膳食补充剂或辅助治疗药物提供了重要依据。尽管本研究取得一定的实验结果, 但是芹菜素抑制血管斑块形成的机制及芹菜素调控 *FBPI* 的机制还需要进一步的深入研究。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

#### 参考文献

- [1] Libby P. The changing landscape of atherosclerosis [J]. *Nature*, 2021, 592(7855): 524-533.

- [2] 万宛若, 黄丹, 徐婉茹, 等. 中药成分改善动脉粥样硬化及其机制研究进展 [J]. 中草药, 2023, 54(17): 5748-5758.  
Wan W R, Huang D, Xu W R, et al. Research progress on improvement of atherosclerosis by traditional Chinese medicine ingredients and its mechanism [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2023, 54(17): 5748-5758.
- [3] Wolf D, Ley K. Immunity and inflammation in atherosclerosis [J]. Circ Res, 2019, 124(2): 315-327.
- [4] 王增武, 刘静, 李建军, 等. 中国血脂管理指南 (2023 年) [J]. 中国循环杂志, 2023, 38(3): 237-271.  
Wang Z W, Liu J, Li J J, et al. Chinese guideline for lipid management (2023) [J]. Chin Circul J, 2023, 38(3): 237-271.
- [5] Wang B J, Huang S, Li S Q, et al. Hepatotoxicity of statins: A real-world study based on the US Food and Drug Administration Adverse Event Reporting System database [J]. Front Pharmacol, 2025, 15: 1502791.
- [6] Attardo S, Musumeci O, Velardo D, et al. Statins neuromuscular adverse effects [J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(15): 8364.
- [7] Selva-O'Callaghan A, Alvarado-Cardenas M, Pinal-Fernández I, et al. Statin-induced myalgia and myositis: An update on pathogenesis and clinical recommendations [J]. Expert Rev Clin Immunol, 2018, 14(3): 215-224.
- [8] Ding S M, Zhang Z H, Song J, et al. Enhanced bioavailability of apigenin via preparation of a carbon nanopowder solid dispersion [J]. Int J Nanomedicine, 2014, 9: 2327-2333.
- [9] Yang C, Song J, Hwang S, et al. Apigenin enhances apoptosis induction by 5-fluorouracil through regulation of thymidylate synthase in colorectal cancer cells [J]. Redox Biol, 2021, 47: 102144.
- [10] Kashyap P, Shikha D, Thakur M, et al. Functionality of apigenin as a potent antioxidant with emphasis on bioavailability, metabolism, action mechanism and in vitro and in vivo studies: A review [J]. J Food Biochem, 2022, 46(4): e13950.
- [11] Khandelwal N, Chander Y, Kumar R, et al. Antiviral activity of apigenin against buffalopox: Novel mechanistic insights and drug-resistance considerations [J]. Antiviral Res, 2020, 181: 104870.
- [12] Singh V K, Sahoo D, Agrahari K, et al. Anti-inflammatory, anti-proliferative and anti-psoriatic potential of apigenin in RAW 264.7 cells, HaCaT cells and psoriasis like dermatitis in BALB/c mice [J]. Life Sci, 2023, 328: 121909.
- [13] Zhou X W, Wang J, Tan W F. Apigenin suppresses innate immune responses and ameliorates lipopolysaccharide-induced inflammation via inhibition of STING/IRF3 pathway [J]. Am J Chin Med, 2024, 52(2): 471-492.
- [14] Steenman M, Espitia O, Maurel B, et al. Identification of genomic differences among peripheral arterial beds in atherosclerotic and healthy arteries [J]. Sci Rep, 2018, 8(1): 3940.
- [15] Alsaigh T, Evans D, Frankel D, et al. Decoding the transcriptome of calcified atherosclerotic plaque at single-cell resolution [J]. Commun Biol, 2022, 5(1): 1084.
- [16] Hao Y H, Stuart T, Kowalski M H, et al. Dictionary learning for integrative, multimodal and scalable single-cell analysis [J]. Nat Biotechnol, 2024, 42(2): 293-304.
- [17] Faas M, Ipseiz N, Ackermann J, et al. IL-33-induced metabolic reprogramming controls the differentiation of alternatively activated macrophages and the resolution of inflammation [J]. Immunity, 2021, 54(11): 2531-2546.e5.
- [18] Certo M, Rahimzadeh M, Mauro C. Immunometabolism in atherosclerosis: A new understanding of an old disease [J]. Trends Biochem Sci, 2024, 49(9): 791-803.
- [19] Nakamizo S, Sugiura Y, Ishida Y, et al. Activation of the pentose phosphate pathway in macrophages is crucial for granuloma formation in sarcoidosis [J]. J Clin Invest, 2023, 133(23): e171088.
- [20] Li L X, Du Z L, Rong B, et al. Foam cells promote atherosclerosis progression by releasing CXCL12 [J]. Biosci Rep, 2020, 40(1): BSR20193267.
- [21] Murad H A S, Rafeeq M M, Alqurashi T M A. Role and implications of the CXCL12/CXCR4/CXCR7 axis in atherosclerosis: Still a debate [J]. Ann Med, 2021, 53(1): 1598-1612.
- [22] Gao J H, Yu X H, Tang C K. CXC chemokine ligand 12 (CXCL12) in atherosclerosis: An underlying therapeutic target [J]. Clin Chim Acta, 2019, 495: 538-544.
- [23] 李心乐, 李小竟, 赖鸿鹄, 等. 基于网络药理学和分子对接技术探讨归脾汤治疗失眠的作用机制 [J]. 环球中医药, 2025, 18(6): 1167-1178.  
Li X L, Li X J, Lai H H, et al. Exploring the mechanism of Guipi Decoction in treating insomnia based on network pharmacology and molecular docking [J]. Global Tradit Chin Med, 2025, 18(6): 1167-1178.
- [24] 国家心血管病中心, 中国心血管健康与疾病报告编写

- 组. 中国心血管健康与疾病报告 2023 概要 [J]. 中国循环杂志, 2024, 39(7): 625-660.
- National Center for Cardiovascular Diseases, the Writing Committee of the Report on Cardiovascular Health and Diseases in China. Report on Cardiovascular Health and Diseases in China 2023: An Updated Summary [J]. Chin Circul J, 2024, 39(7): 625-660.
- [25] 伍卫红, 黄燕秋, 李嘉俊, 等. 辣木叶水提物对油酸钠-棕榈酸酯诱导的 HepG2 细胞脂质代谢及抗氧化能力的影响 [J]. 药物评价研究, 2023, 46(10): 2152-2158.
- Wu W H, Huang Y Q, Li J J, et al. Effects of *Moringa oleifera* leaf aqueous extract on lipid metabolism and antioxidant capacity in HepG2 cells induced by sodium oleate-sodium palmitate [J]. Drug Eval Res, 2023, 46(10): 2152-2158.
- [26] Lu Z, Liu L, Zhao S X, et al. Apigenin attenuates atherosclerosis and non-alcoholic fatty liver disease through inhibition of NLRP3 inflammasome in mice [J]. Sci Rep, 2023, 13(1): 7996.
- [27] Zhou X W, Wang J, Tan W F. Apigenin suppresses innate immune responses and ameliorates lipopolysaccharide-induced inflammation via inhibition of STING/IRF3 pathway [J]. Am J Chin Med, 2024, 52(2): 471-492.
- [28] Ren K, Jiang T, Zhou H F, et al. Apigenin retards atherogenesis by promoting ABCA1-mediated cholesterol efflux and suppressing inflammation [J]. Cell Physiol Biochem, 2018, 47(5): 2170-2184.
- [29] Wong T Y, Lin S M, Leung L K. The flavone apigenin blocks nuclear translocation of sterol regulatory element-binding protein-2 in the hepatic cells WRL-68 [J]. Br J Nutr, 2015, 113(12): 1844-1852.
- [30] Franczyk B, Rysz J, Ławiński J, Rysz-Górczyńska M, Gluba-Brzózka A. Is a High HDL-Cholesterol Level Always Beneficial? [J]. Biomed, 2021, 9(9): 1083.
- [31] Rader DJ, Hovingh GK. HDL and cardiovascular disease [J]. Lancet, 2014, 384: 618-625.

[责任编辑 齐静雯]