

• 药理与临床 •

补阳还五汤苷类组分调控动脉粥样硬化炎症反应及脂质代谢的作用机制

傅馨莹¹, 杨仁义¹, 孙正骥¹, 李艳玲¹, 龙清吟¹, 李俊熙¹, 吴露^{2*}, 张伟^{1*}

1. 湖南中医药大学, 湖南 长沙 410208

2. 浏阳市中医医院, 湖南 浏阳 410300

摘要: **目的** 采用网络药理学结合体外实验验证的方法, 探讨补阳还五汤苷类组分治疗动脉粥样硬化 (atherosclerosis, AS) 的作用机制。 **方法** 采用网络药理学方法对补阳还五汤苷类组分与阿托伐他汀治疗 AS 的靶点和通路进行预测; SD 大鼠随机分为对照组、补阳还五汤 (10.8 g/kg) 组、苷类组分 (0.64 g/kg) 组和阿托伐他汀 (0.9 mg/kg) 组, 各给药组 ig 相应药物, 2 次/d, 连续 7 次, 制备空白血清、补阳还五汤血清、苷类组分血清及阿托伐他汀血清。采用试剂盒考察含药血清对氧化型低密度脂蛋白 (oxidized low density lipoprotein, ox-LDL) 诱导的小鼠单核巨噬细胞 RAW264.7 脂质含量的影响; 采用油红 O 染色考察含药血清对 ox-LDL 诱导的 RAW264.7 细胞泡沫细胞形成率的影响; 采用 ELISA 试剂盒观察含药血清对 ox-LDL 诱导的 RAW264.7 细胞上清液肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 和白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6) 水平的影响; 采用 Western blotting 考察含药血清对 ox-LDL 诱导的 RAW264.7 细胞 Janus 蛋白酪氨酸激酶 2 (Janus kinase-2, JAK2)、磷酸化 JAK2 (p-JAK2)、信号转导和转录激活因子 3 (signal transducer and activator of transcription 3, STAT3) 和 p-STAT3 蛋白表达的影响; 采用 qRT-PCR 考察含药血清对 ox-LDL 诱导的 RAW264.7 细胞 JAK2 和 STAT3 mRNA 表达的影响。 **结果** 与模型组比较, 各给药组细胞内脂质沉积减少, RAW264.7 细胞吞噬脂质受到抑制, 泡沫化细胞数量减少, 上清液中 TNF- α 和 IL-6 水平显著降低 ($P < 0.01$), 细胞内总胆固醇 (total cholesterol, TC)、游离胆固醇 (free cholesterol, FC) 和胆固醇酯 (cholesteryl ester, CE) 含量显著减少 ($P < 0.01$), JAK2/STAT3 通路相关蛋白及 mRNA 表达水平显著降低 ($P < 0.01$)。 **结论** 补阳还五汤苷类组分是治疗 AS 的主要药效物质, 其作用机制可能与降低细胞内脂质沉积、抑制 JAK2/STAT3 信号通路、抑制炎症因子分泌有关。

关键词: 补阳还五汤; 苷类组分; 阿托伐他汀; 动脉粥样硬化; 炎症反应; 脂质代谢; 网络药理学

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2021)14-4221-11

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.14.013

Mechanism of glycosides of Buyang Huanwu Decoction on regulating atherosclerotic inflammation and lipid metabolism

FU Xin-ying¹, YANG Ren-yi¹, SUN Zheng-ji¹, LI Yan-ling¹, LONG Qing-yin¹, LI Jun-xi¹, WU Lu², ZHANG Wei¹

1. Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410208, China

2. Liuyang Hospital of Traditional Chinese Medicine, Liuyang 410300, China

Abstract: **Objective** To explore the mechanism of Buyang Huanwu Decoction (补阳还五汤) glycosides on treatment of atherosclerosis (AS) by network pharmacology combined with *in vitro* experiment. **Methods** Network pharmacology method was used to predict the target and pathway of Buyang Huanwu Decoction glycosides and atorvastatin in the treatment of AS. SD rats were randomly divided into control group, Buyang Huanwu Decoction (10.8 g/kg) group, glycoside component (0.64 g/kg) group and atorvastatin (0.9 mg/kg) group, rats in each administration group were ig corresponding drugs, twice one day for 7 d. The blank serum, Buyang Huanwu Decoction serum, glycoside component serum and atorvastatin serum were prepared. Kit was used to

收稿日期: 2021-03-11

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81774032); 湖南省自然科学基金杰出青年基金资助项目 (2020JJ2024); 湖南省自然科学基金资助项目 (2018JJ3391); 湖南省教育厅科学研究重点项目 (19A374); 湖南中医药大学研究生培养质量工程专项 (2020CX62)

作者简介: 傅馨莹 (1996—), 女, 硕士研究生, 研究方向为中西医结合防治心脑血管疾病。E-mail: 793927811@qq.com

***通信作者:** 张伟 (1979—), 男, 博士, 教授, 研究方向为中西医结合防治心脑血管疾病。E-mail: zhangwei1979@hnu.edu.cn

吴露 (1981—), 女, 硕士, 主任医师, 研究方向为中西医结合防治心脑血管疾病。E-mail: w109131202@163.com

investigate the effect of drug-containing serum on lipid content of RAW264.7 cells induced by oxidized low-density lipoprotein (ox-LDL); Oil red O staining was used to investigate the effect of drug-containing serum on foam cell formation rate of RAW264.7 cells induced by ox-LDL; ELISA kit was used to investigate the effect of drug-containing serum on levels of tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-6 (IL-6) in the supernatant of RAW264.7 cells induced by ox-LDL; Western blotting was used to investigate the effect of drug-containing serum on expressions of Janus protein tyrosine kinase 2 (JAK2), phosphorylated JAK2 (p-JAK2), signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) and p-STAT3 in RAW264.7 cells induced by ox-LDL; qRT-PCR was used to investigate the effect of drug-containing serum on JAK2 and STAT3 mRNA expressions in RAW264.7 cells induced by ox-LDL.

Results Compared with model group, the intracellular lipid deposition of each administration group was reduced, the phagocytic lipid of RAW264.7 cells was inhibited, the number of foamed cells was reduced; Levels of TNF- α and IL-6 in the supernatant were significantly reduced ($P < 0.01$); Intracellular total cholesterol (TC), free cholesterol (FC) and cholesterol ester (CE) content were significantly reduced ($P < 0.01$); Expressions of JAK2/STAT3 pathway related protein and mRNA were significantly reduced ($P < 0.01$). **Conclusion** Glycoside components of Buyang Huanwu Decoction are the main pharmacological substances for the treatment of AS, of which mechanism may be related to the reduction of intracellular lipid deposition, inhibition of JAK2/STAT3 signal pathway, and inhibition the secretion of inflammatory factors.

Key words: Buyang Huanwu Decoction; glycosides; atorvastatin; atherosclerosis; inflammatory reaction; lipid metabolism; network pharmacology

动脉粥样硬化 (atherosclerosis, AS) 与血管内膜下的脂质蓄积及局部血管炎性反应密切相关, 氧化型低密度脂蛋白 (oxidized low density lipoprotein, ox-LDL) 在血管内膜下聚集, 巨噬细胞吞噬 ox-LDL 形成的泡沫细胞不断增多, 释放大炎症因子, 局部血管发生炎性反应, 促进脂质蓄积和细胞泡沫化, 最终形成粥样斑块。AS 病变过程中, 脂质蓄积常伴有炎性反应的发生^[1]。《动脉粥样硬化中西医结合诊疗专家共识》^[2]指出, 抗 AS 的关键在于早期干预血脂异常、肥胖、高血压等危险因素, 他汀类药物能够显著降低低密度脂蛋白胆固醇 (low-density lipoprotein cholesterol, LDL-C) 水平并升高高密度脂蛋白胆固醇 (high-density lipoprotein cholesterol, HDL-C) 水平, 具有稳定或消退粥样斑块的作用, 可以降低心脑血管疾病发生率。他汀类药物可以有效地调脂稳斑, 但其抑制血管炎性反应作用较弱, 目前临床上尚无特异性针对动脉粥样硬化炎性反应的有效药物。《动脉粥样硬化中西医结合诊疗专家共识》规范了中西医诊疗方案, 将 AS 分为痰瘀互结、气阴两虚、气虚血瘀、气滞血瘀 4 证, 面色淡白而乏力身倦, 伴有气虚懒言, 痛如针刺, 舌暗或紫斑, 脉沉而涩者, 可予以补阳还五汤治之^[3]。补阳还五汤能够降低斑块内巨噬细胞含量, 抑制泡沫细胞形成^[4]; 抑制斑块中脂质蓄积及炎症因子分泌, 抑制炎症反应, 加速脂质代谢^[5]。

课题组前期研究表明, 补阳还五汤苷类组分具有抑制炎症因子表达、减少炎症因子生成的作用^[6-7];

补阳还五汤苷类组分可以抑制血管内膜增生, 具有修复内皮的作用, 可能与调节血脂水平、改善局部微环境有关^[8], 但补阳还五汤苷类组分抗炎及调血脂的作用机制尚不明确。近年来, 中西医结合治疗模式展现出协同增益效用, 基于此推测补阳还五汤苷类组分与阿托伐他汀在治疗 AS 炎性反应和脂质代谢上具有协同作用。本研究基于网络药理学系统分析补阳还五汤苷类组分与阿托伐他汀治疗 AS 的作用机制, 从生物信息学角度挖掘出二者的潜在靶点及作用通路, 并用体外实验进行验证, 为中西医结合抗 AS 奠定药物基础, 为后续临床转化研究提供新方向。

1 方法

1.1 网络药理学分析

1.1.1 数据库及软件 PubChem 数据库 (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>); Swiss Target Prediction 数据库 (<http://www.swisstargetprediction.ch/>); GeneCards 数据库 (<https://www.genecards.org/>); OMIM 数据库 (<https://omim.org/>); 中医药整合药理学研究平台 (TCMIP, <http://www.tcmip.cn/TCMIP/index.php/Home/>); String 数据库 (<https://string-db.org/>); WebGestalt 数据库 (<http://www.webgestalt.org/#>); DAVID 数据库 (<https://david.ncifcrf.gov/>); Cytoscape 3.7.2 软件。

1.1.2 药物作用靶点预测 将补阳还五汤苷类组分的主要成分黄芪甲苷、芍药苷、苦杏仁苷及阿托伐他汀录入 PubChem 数据库, 收集其化学结构式;

将各化学结构式导入 Swiss Target Prediction 数据库对作用靶点进行预测, 获得作用靶点, 整合 4 个成分作用靶点并去除重复值, 获得药物相关作用靶点。

1.1.3 疾病相关靶点预测 以“atherosclerosis”“atherogenesis”为关键词, 在 GeneCards、OMIM 及 TCMIP 数据库检索相关靶点信息, 整合 3 个数据库检索结果并去除重复值, 获得疾病相关靶点。

1.1.4 药物-疾病靶点筛选 取交集, 获得药物活性成分与 AS 的共同靶点, 绘制韦恩图。

1.1.5 药物-疾病靶点蛋白质-蛋白质相互作用 (protein-protein interaction, PPI) 网络的构建 将所得到的共同靶点导入 String 数据库, 获取 PPI 网络图, 并导入 Cytoscape, 使 PPI 网络可视化。利用 cytoHubba 插件对共同靶点进行拓扑分析, 选取富集于前 20 的靶点, 得到网络图。

1.1.6 药物-疾病共同靶点基因本体 (gene ontology, GO) 及京都基因与基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 通路富集分析 通过 WebGestalt 数据库, 将共同靶点进行 GO 富集分析, 分别导出生物过程 (biological process, BP)、细胞组分 (cellular component, CC)、分子功能 (molecular function, MF) 富集分析数据, 进行“加权集合覆盖”分析; 将共同靶点导入 DAVID 数据库, 进行 KEGG 通路富集分析, 利用 Cytoscape 软件对前 20 的通路与该通路涉及靶点构建“靶点-通路”网络。

1.2 实验验证

1.2.1 动物 SPF 级雄性 SD 大鼠 20 只, 5~6 周龄, 体质量 180~200 g, 购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司, 动物合格证号 SCXK (湘) 2019-000。动物饲养于湖南中医药大学实验动物中心, 昼夜交替各 12 h, 温度 21~26 °C, 湿度 40%~50%。动物实验经湖南中医药大学实验动物伦理委员会批准 (伦理号 LL2019102503)。

1.2.2 细胞 小鼠单核巨噬细胞 RAW264.7 购自中国科学院上海生命科学研究院细胞细胞库。

1.2.3 药材 补阳还五汤由黄芪 60 g、赤芍 9 g、川芎 6 g、当归 9 g、地龙 9 g、红花 9 g、桃仁 9 g 组成, 黄芪 (批号 190902)、赤芍 (批号 190701)、川芎 (批号 190902)、当归 (批号 190802)、地龙 (批号 191001)、红花 (批号 190901)、桃仁 (批号 191101) 购自湖南新汇医药有限公司, 经湖南中医药大学第一附属医院左亚杰教授鉴定分别为豆科植物蒙古黄

芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao 的干燥根、毛茛科植物川赤芍 *Paeonia veitchii* Lynch. 的根、伞形科植物川芎 *Ligusticum chuanxiong* Hort. 的根茎、伞形科植物当归 *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels. 的根尾、钜蚓科动物参环毛蚓 *Pheretima aspergillum* (E. Perrier) 的去内脏全体、菊科植物红花 *Carthamus tinctorius* L. 的花、蔷薇科植物桃 *Amygdalus persica* Linn. 的干燥成熟种子, 均符合《中国药典》2020 年版规定。

1.2.4 药品与试剂 阿托伐他汀片 (批号 H20133127, 10 mg/片) 购自浙江乐普药业股份有限公司; DMEM 高糖培养基 (批号 PM150210)、特级胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS, 批号 164210-500) 购自武汉普诺赛生命科技有限公司; ox-LDL (批号 YB-002) 购自广州奕源生物科技有限公司; CCK8 试剂盒 (批号 BS350B) 购自上海白鲨生物科技有限公司; 油红 O 染色液 (批号 G1262-4) 购自北京索莱宝科技有限公司; 肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6) ELISA 试剂盒 (批号分别为 E-EL-M0049c、E-EL-M0044c) 购自武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司; 细胞总胆固醇 (total cholesterol, TC)、游离胆固醇 (free cholesterol, FC) 试剂盒 (批号分别为 E1015-50、E1016-50) 购自北京普利莱基因技术有限公司; BCA 蛋白定量试剂盒 (批号 70-PQ0012) 购自上海碧云天生物技术有限公司; ECL 高效化学发光试剂盒 (批号 GE2301-100) 购自美国 Genview 公司; Janus 蛋白酪氨酸激酶 2 (Janus kinase-2, JAK2) 抗体、磷酸化 JAK2 (p-JAK2) 抗体、信号转导和转录激活因子 3 (signal transducer and activator of transcription 3, STAT3) 抗体、p-STAT3 抗体 (批号分别为 ab108596、ab32101、ab68153、ab76315) 购自英国 Abcam 公司; β -actin 抗体、HRP 标记的山羊抗兔 IgG 抗体 (批号分别为 02536-1-AP、SA00001-2) 购自武汉三鹰生物技术有限公司; 总 RNA 提取试剂盒 (批号 DP419) 购自北京天根生化科技有限公司; 逆转录试剂盒、扩增试剂盒 (批号 E047、E096) 购自上海近岸科技有限公司; JAK2、STAT3、 β -actin 引物由南京金斯瑞生物科技有限公司合成。

1.2.5 仪器 CO₂ 培养箱 (德国 Heraeus 公司); SW-CJ-1FD 超净工作台 (苏州苏净仪器自控设备有限公司); Cytation 3 型多功能酶标仪 (美国 Bio-Tek

公司); Heraeus Fresco 17 型超速冷冻离心机(美国 Thermo Fisher Scientific 公司); T100 Thermal Cycler qRT-PCR 仪、Gel Doc XR+凝胶成像系统、Mini-PROTEAN Tetra 型电泳槽、Mini Trans-Blot 型转印槽(美国 Bio-Rad 公司)。

1.2.6 补阳还五汤的制备 补阳还五汤浸膏由湖南中药研究所制备,取原方药材,浸泡 30 min 后,加入 12 倍量水煎煮 2 h,滤过;再加入 10 倍量水煎煮 1.5 h,滤过;合并 2 次滤液,浓缩至 100 mL,减压干燥浓缩为干膏(21.32 g/付),不加辅料打磨成粉,密封备用。补阳还五汤浸膏稀释后,经大孔树脂色谱、高效液相色谱等方法提取苷类组分浸膏(1.286 6 g/付)^[9]。原方提取物和苷类组分提取物以高效液相色谱法进行质控检测,苷类组分中的黄芪甲苷、苦杏仁苷、芍药苷质量分数分别为 37.98、5.48、103.6 mg/g^[10]。

1.2.7 含药血清的制备 根据前期预实验结果,SD 大鼠随机分为对照组、补阳还五汤(10.8 g/kg)组、苷类组分(0.64 g/kg)组和阿托伐他汀(0.9 mg/kg)组,每组 5 只。各给药组 ig 相应药物,对照组 ig 等体积 0.9%氯化钠溶液,2 次/d,连续 7 次。于末次给药 2 h 后,大鼠 ip 10%戊巴比妥钠麻醉,腹主动脉取血,取血后脱颈椎处死。全血 3000 r/min 离心 15 min,取上层血清,分别得到空白血清、补阳还五汤血清、苷类组分血清及阿托伐他汀血清,于恒温水浴锅 56 °C 灭活 30 min,滤过分装,于 -80 °C 保存。

1.2.8 ox-LDL 对 RAW264.7 细胞存活率的影响 取处于对数生长期的 RAW264.7 细胞,以 1×10^5 /孔接种于 96 孔板,待细胞贴壁。设置对照组和 ox-LDL (25、50、75、100、125 $\mu\text{g/mL}$) 组,各给药组加入相应溶液,对照组加入含 10% FBS 的 DMEM 培养基,分别培养 0、3、6、12、24、48 h,加入 CCK8 试剂,于 37 °C、5% CO₂ 恒温培养箱孵育 40 min,采用酶标仪测定 450 nm 处的吸光度(A)值,计算细胞存活率。

$$\text{细胞存活率} = (A_{\text{给药}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})$$

1.2.9 ox-LDL 对 RAW264.7 细胞泡沫化的影响 在确定对 RAW264.7 细胞活力无影响的 ox-LDL 质量浓度范围(0~100 $\mu\text{g/mL}$)及刺激时间(0~24 h)后,将处于对数生长期的 RAW264.7 细胞以 2.5×10^5 /孔接种于放有细胞爬片的 24 孔板中,待细胞贴壁。加入 ox-LDL (50 $\mu\text{g/mL}$),分别培养 0、3、6、

12、24 h,以确定 ox-LDL 对 RAW264.7 细胞泡沫化的合适时间;加入含不同质量浓度 ox-LDL (0、25、50、75、100 $\mu\text{g/mL}$) 的 10% FBS DMEM 培养基,培养 24 h,以确定 ox-LDL 对 RAW264.7 细胞泡沫化的合适质量浓度。取出细胞,按试剂盒说明书进行染色,甘油封片。染色后细胞内可见明显红色脂质颗粒。

1.2.10 CCK8 法确定含药血清作用于 RAW264.7 细胞的浓度和时间 将处于对数生长期的 RAW264.7 细胞以 1×10^5 /孔接种于 96 孔板,待细胞贴壁。设置对照组和空白血清(1%、5%、10%、15%、20%)组,空白血清组加入含不同浓度空白血清的 DMEM 培养基,对照组加入含 10% FBS 的 DMEM 培养基,培养 24 h,加入 CCK8 试剂,于 37 °C、5% CO₂ 恒温培养箱孵育 40 min,采用酶标仪测定 450 nm 处的 A 值,计算空白血清对细胞生长的抑制率,获得无细胞毒性的含药血清浓度。

$$\text{细胞抑制率} = (A_{\text{对照}} - A_{\text{给药}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})$$

1.2.11 细胞分组及干预 在确定造模条件后,将处于对数生长期的 RAW264.7 细胞以 1×10^6 /孔接种于 6 孔板,待细胞贴壁。设置对照组、模型组、补阳还五汤(10%)组和苷类组分高、中、低剂量(10.0%、5.0%、2.5%)组及阿托伐他汀(10%)组。对照组和模型组加入 10%空白血清,苷类组分高剂量组加入 10%苷类组分血清,苷类组分中剂量组加入 5%苷类组分血清和 5%空白血清,苷类组分低剂量组加入 2.5%苷类组分血清和 7.5%空白血清,补阳还五汤组和阿托伐他汀组分别加入 10%补阳还五汤血清及 10%阿托伐他汀血清,预处理 3 h;再加入含 ox-LDL (75 $\mu\text{g/mL}$) 的含药或空白血清的 DMEM 培养基干预 24 h。

1.2.12 含药血清对 RAW264.7 细胞内脂质含量的影响 按“1.2.11”项下方法处理细胞和分组,弃去培养基,PBS 洗涤 3 次,加入裂解液反应 10 min,离心取上清,采用 BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度。按试剂盒说明书测定各组细胞内 TC 及 FC 含量,胆固醇酯(cholesteryl ester, CE)为 TC 与 FC 的差值,CE/TC>50%为泡沫细胞模型的标准^[11]。

1.2.13 含药血清对 RAW264.7 细胞泡沫化程度的影响 按“1.2.11”项下方法处理细胞和分组,进行油红 O 染色,于显微镜下随机观察 6 个不重合的视野,取细胞内含有 5 个以上较大红色染料颗粒作为泡沫细胞形成的标准^[12],计数泡沫化细胞并计算泡

泡沫细胞阳性率。

泡沫细胞阳性率=泡沫细胞数/细胞总数

1.2.14 ELISA 检测含药血清对 RAW264.7 细胞上清液中 TNF- α 和 IL-6 水平的影响 按“1.2.11”项下方法处理细胞和分组,吸取上清,离心,收集上清液,按 ELISA 试剂盒说明书测定细胞上清液中 TNF- α 和 IL-6 水平。

1.2.15 Western blotting 检测含药血清对 RAW264.7 细胞 JAK2、p-JAK2、STAT3 和 p-STAT3 蛋白表达的影响 按“1.2.11”项下方法处理细胞和分组,收集各组细胞,加入含蛋白酶抑制剂、磷酸酶抑制剂的 RIPA 蛋白裂解液,提取细胞总蛋白,采用 BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋白质量浓度,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% 牛奶或牛血清白蛋白室温封闭 90 min,分别加入 β -actin (1:6000)、JAK2 (1:2000)、p-JAK2 (1:2000)、STAT3 (1:2000) 和 p-STAT3 (1:2000) 抗体,4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜;加入 HRP 标记的山羊抗兔 IgG 抗体 (1:6000),37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 60 min;采用 ECL 高效化学发光试剂盒显影,并用 Image Lab 4.0 软件进行定量分析。

1.2.16 qRT-PCR 检测含药血清对 RAW264.7 细胞 JAK2 和 STAT3 mRNA 表达的影响 按“1.2.11”项下方法处理细胞和分组,按照试剂盒说明书提取细胞总 RNA 并合成 cDNA,进行 qRT-PCR 分析。引物序列: JAK2 上游引物 5'-CGCTCAGACAGTATC-ATCT-3',下游引物 5'-CTCCAACCTTCTCTTCTT-ACAC-3'; STAT3 上游引物 5'-AGGACATCAGTG-GCAAGA-3',下游引物 5'-AGGTAGACAAGTGG-AGACA-3'; β -actin 上游引物 5'-TTCCAGCCTTCC-TTCTTG-3',下游引物 5'-GGAGCCAGAGCAGTA-ATC-3'。

1.3 统计学分析

使用 SPSS 23.0 软件进行统计,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较若符合正态性且方差齐性时,采用单因素方差分析 LSD 法进行两两比较;方差不齐时,采用 Tamhane's T_2 法进行两两比较;若不符合正态性时,采用 Kruskal-Wallis 秩和检验。计数资料以率表示,采用 χ^2 检验分析。

2 结果

2.1 网络药理学分析

2.1.1 药物抗 AS 靶点预测 通过 Swiss Target Prediction 数据库获得药物主要成分相关作用靶点

163 个,其中黄芪甲苷 26 个、芍药苷 24 个、苦杏仁苷 38 个、阿托伐他汀 100 个。通过 GeneCards、OMIM 及 TCMIP 得到疾病相关作用靶点 1165 个。通过 Bioinformatics Gent 数据库取交集,获得药物-疾病共同靶点 65 个,韦恩图见图 1。

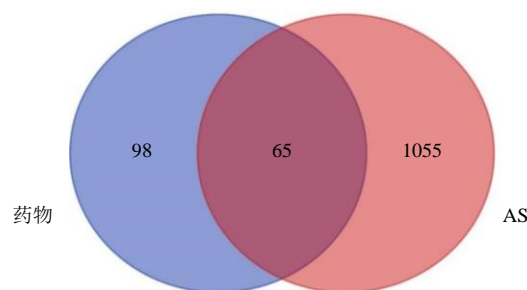


图 1 药物-疾病相关作用靶点韦恩图

Fig. 1 Venn diagram of drug-disease related targets

2.1.2 共同靶点 PPI 网络分析 将共同靶点导入 String 数据库及 Cytoscape 软件,获得有 63 个靶点的 PPI 网络图,见图 2。用 CytoHubba 插件对 PPI 网络图进行拓扑分析,得到富集于前 20 靶点的网络图,见图 3。度值、紧密度、介数从高到低的前 5 位为相同靶点,依次为 TNF、蛋白激酶 B (protein kinase B, AKT1)、血管内皮生长因子 A (vascular endothelial growth factor-A, VEGFA)、STAT3、半胱氨酸蛋白酶-3 (Caspase-3, CASP3),表明这些靶点在整个网络中影响能力大,受其他靶点的影响小,在治疗 AS 中发挥重要的作用。

2.1.3 GO 和 KEGG 通路富集分析 通过 WebGestalt 数据库,获得 GO 富集分析结果,其中 BP 分析结果 260 个、CC 分析结果 2 个、MF 分析结果 17 个。GO 富集分析显示,共同靶点主要分布于细胞外基质、膜区,通过调节转录因子、内肽酶、磷脂酰肌醇激酶等活性以及与磷酸酶、糖胺聚糖、脂多糖、细胞因子受体等结合的方式,参与炎症反应的调节、白细胞迁移、肌细胞增殖、脂质定位、传导细胞内受体信号等生物过程。通过 DAVID 数据库,获得 KEGG 通路富集分析结果,共富集 78 条通路,“靶点-通路”网络见图 4,药物主要通过参与 HIF-1、JAK/STAT、Rap1、VEGF 等信号通路治疗 AS。

2.2 实验验证

结合网络药理学分析结果,为进一步探讨补阳还五汤苷类组分与阿托伐他汀在治疗 AS 的作用,本研究基于 JAK2/STAT3 信号通路,以炎症反应和脂质代谢异常为切入点,在 RAW264.7 细胞泡沫化

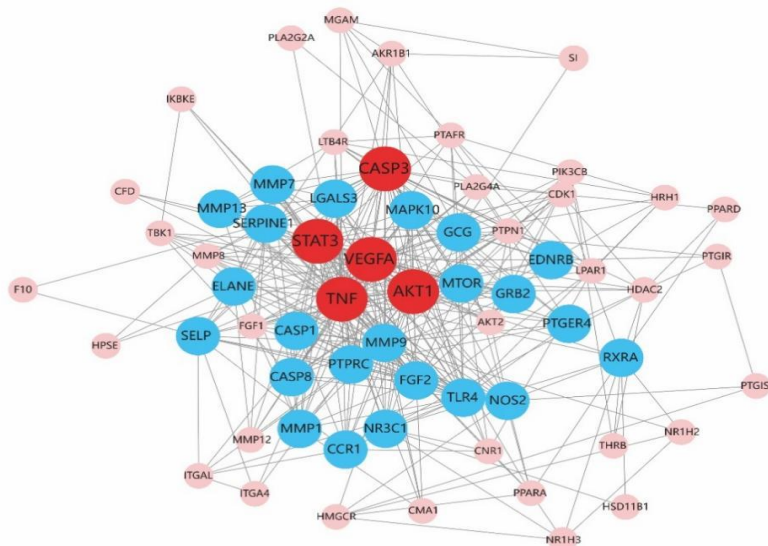


图2 “药物-疾病”靶点PPI网络

Fig. 2 PPI network of “drug-disease” targets

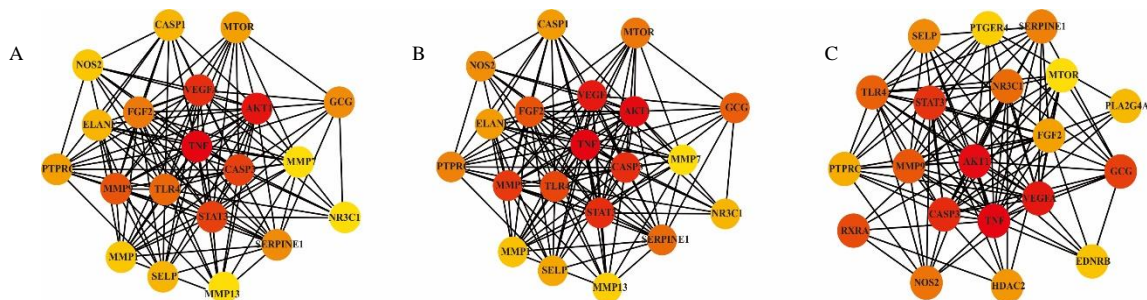


图3 度值 (A)、紧密度 (B) 和介数 (C) 拓扑分析图

Fig. 3 Topology analysis diagram of degree (A), closeness (B) and betweenness (C)

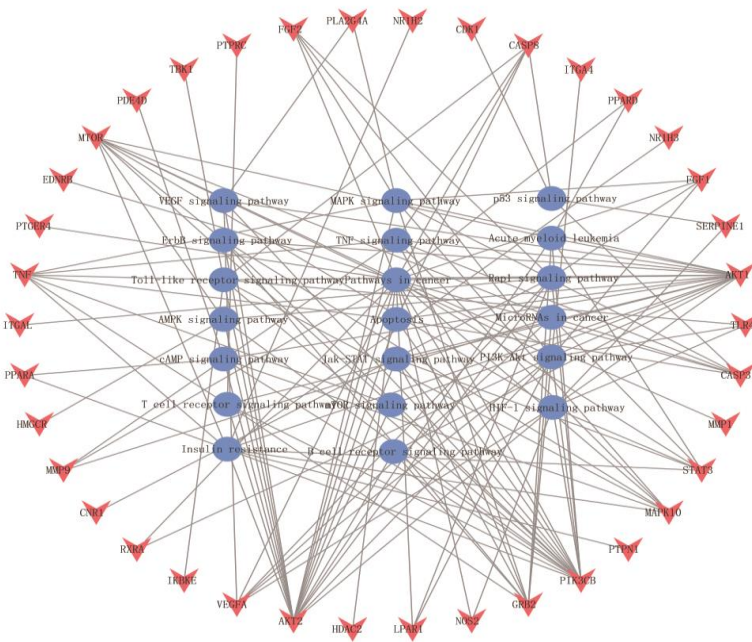


图4 “靶点-通路”网络

Fig. 4 “Target-pathway” network

模型中研究联合用药对脂质含量、泡沫化程度及炎症因子的影响,为中西医结合治疗 AS 的协同增益效用提供实验基础。

2.2.1 ox-LDL 对 RAW264.7 细胞活力的影响 如表 1 所示,与对照组比较,ox-LDL (125 $\mu\text{g/mL}$) 作用于 RAW264.7 细胞 3、6、12、48 h 均显著降低细胞活力 ($P<0.05$ 、 0.01),抑制细胞增殖;ox-LDL (50、75、100 $\mu\text{g/mL}$) 作用于 RAW264.7 细胞 48 h 显著降低细胞活力 ($P<0.05$ 、 0.01)。ox-LDL (0~100 $\mu\text{g/mL}$) 作用于 RAW264.7 细胞 0~24 h,细胞活力无明显影响。

2.2.2 ox-LDL 对 RAW264.7 细胞泡沫化的影响 细胞吞噬 ox-LDL 后,细胞内脂质大量积聚形成泡沫细胞,为了确定 ox-LDL 诱导 RAW264.7 细胞泡沫化的最佳时间和最佳质量浓度,通过油红 O 染色检测 ox-LDL 干预后 RAW264.7 细胞泡沫化程度。如图 5 所示,与对照组相比,ox-LDL (50 $\mu\text{g/mL}$) 作用于细胞后,胞内脂质明显增多,泡沫化程度逐渐增加,呈时间相关性。如图 6 所示,随着 ox-LDL

质量浓度的增加,细胞泡沫化程度逐渐增强;当 ox-LDL 质量浓度为 75 $\mu\text{g/mL}$ 时,细胞内有大量脂质存在,细胞体积增大,多呈圆形,泡沫化程度较高,其后泡沫化程度未见明显增高。由此确定以 ox-LDL (75 $\mu\text{g/mL}$) 刺激 RAW264.7 细胞 24 h 为造模条件。

2.2.3 空白血清的细胞毒性实验 如图 7 所示,与对照组比较,血清浓度为 1%、5%、15%、20% 时,对细胞有明显的抑制作用 ($P<0.05$ 、 0.01)。因此,选取 10% 血清浓度为无细胞毒性的血清浓度。

2.2.4 含药血清对 RAW264.7 细胞内脂质含量的影响 如图 8 所示,与对照组相比,模型组细胞内 TC、FC、CE 含量和 CE/TC 值明显升高 ($P<0.01$);与模型组相比,补阳还五汤、苷类组分高、低剂量组以及阿托伐他汀组细胞内 TC、FC、CE 含量显著降低 ($P<0.01$),苷类组分中剂量组细胞内 TC、CE 含量显著降低 ($P<0.01$),苷类组分高、中剂量组以及阿托伐他汀组细胞内 CE/TC 值显著降低 ($P<0.05$ 、 0.01)。

表 1 ox-LDL 对 RAW264.7 细胞活力的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 1 Effect of ox-LDL on viability of RAW264.7 cells ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量/ $(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	细胞存活率/%					
		0 h	3 h	6 h	12 h	24 h	48 h
对照	—	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
ox-LDL	25	100.00	98.29 \pm 8.65	99.51 \pm 12.05	114.26 \pm 12.14 [#]	105.22 \pm 6.45	105.76 \pm 5.79
	50	100.00	101.03 \pm 9.54	99.22 \pm 7.23	95.65 \pm 10.62	105.31 \pm 7.46	91.40 \pm 2.12 [#]
	75	100.00	96.91 \pm 5.36	95.16 \pm 6.55	94.85 \pm 7.04	101.63 \pm 5.87	70.59 \pm 5.99 ^{##}
	100	100.00	92.86 \pm 10.61	94.70 \pm 10.88	93.51 \pm 6.00	100.24 \pm 3.94	58.96 \pm 2.32 ^{##}
	125	100.00	91.66 \pm 7.54 [#]	93.75 \pm 3.32 [#]	83.68 \pm 6.31 ^{##}	94.45 \pm 3.86	28.70 \pm 10.75 ^{##}

与对照组比较: [#] $P<0.05$ ^{##} $P<0.01$

[#] $P<0.05$ ^{##} $P<0.01$ vs control group

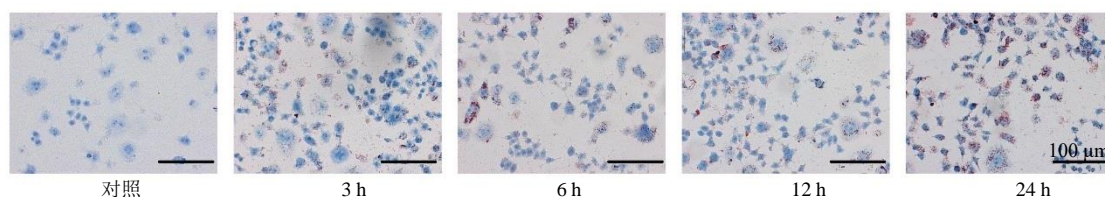


图 5 ox-LDL (50 $\mu\text{g/mL}$) 对 RAW264.7 细胞泡沫化的影响 ($\times 200$)

Fig. 5 Effect of ox-LDL (50 $\mu\text{g/mL}$) on foaming of RAW264.7 cells ($\times 200$)

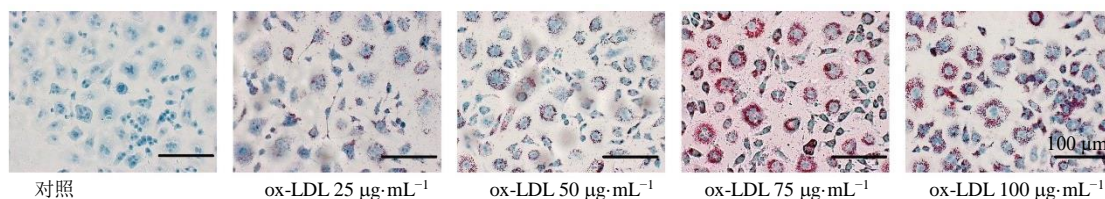


图 6 ox-LDL 对 RAW264.7 细胞泡沫化的影响 ($\times 200$)

Fig. 6 Effect of ox-LDL on foaming of RAW264.7 cells ($\times 200$)

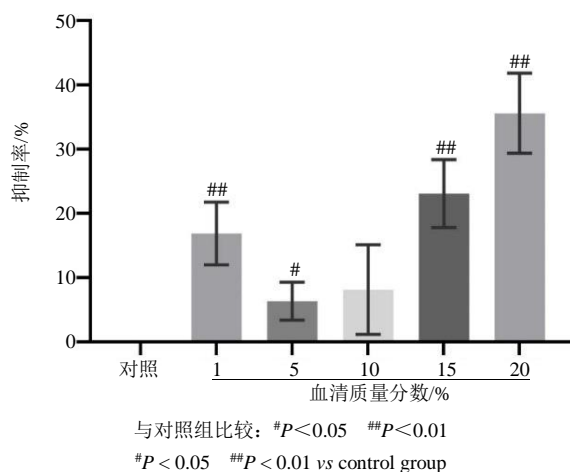
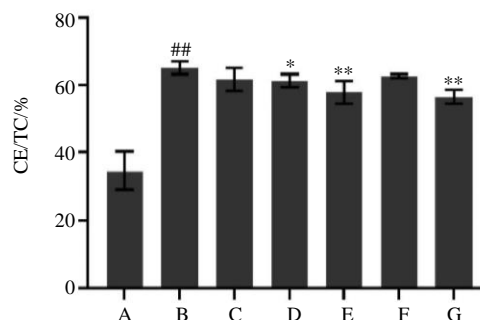
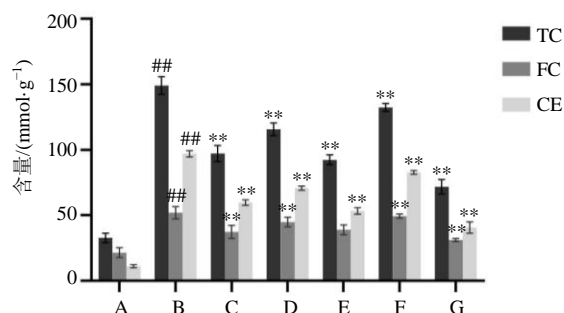


图 7 空白血清对 RAW264.7 细胞抑制率的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Fig. 7 Effect of blank serum on inhibition rate of RAW264.7 cells ($\bar{x} \pm s, n=6$)



A-对照组 B-模型组 C-补阳还五汤组 D-苷类组分高剂量组 E-苷类组分中剂量组 F-苷类组分低剂量组 G-阿托伐他汀组 与对照组比较: ^{##} $P < 0.01$; 与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$, 图 10~12 同

A-control group B-model group C-Buyang Huanwu Decoction group D-glycoside component high-dose group E-glycoside component medium-dose group F-glycoside component low-dose group G-atorvastatin group ^{##} $P < 0.01$ vs control group; ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ vs model group, same as fig.10—12

图 8 含药血清对 RAW264.7 细胞内 TC、FC、CE 含量及 CE/TC 的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Fig. 8 Effect of blank serum on contents of TC, FC, CE and CE/TC in RAW264.7 cells ($\bar{x} \pm s, n=6$)

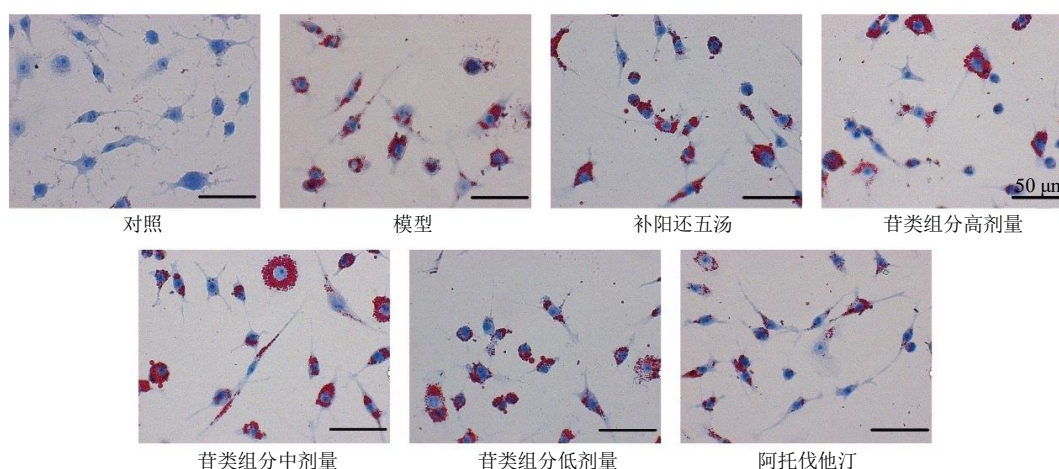


图 9 含药血清对 ox-LDL 干预的 RAW264.7 细胞泡沫化的影响 ($\times 400$)

Fig. 9 Effect of drug-containing serum on foaming of RAW264.7 cells intervened by ox-LDL ($\times 400$)

2.2.5 含药血清对 RAW264.7 细胞泡沫化程度的影响 如图 9 和表 2 所示,对照组细胞形态多呈梭形,细胞内无明显脂质聚集,泡沫化细胞少。与对照组相比,模型组细胞多呈圆形,体积有明显的增大,胞内大量脂质积聚,泡沫化细胞显著增多 ($P < 0.01$)。与模型组相比,补阳还五汤组、苷类组分中剂量组细胞内脂质积聚减少,泡沫化细胞显著减少 ($P < 0.05$);阿托伐他汀组细胞内脂质积聚显著减少,泡沫化细胞显著减少 ($P < 0.01$);苷类组分高、低剂量组细胞内脂质积聚减少。

2.2.6 含药血清对 RAW264.7 细胞炎性因子分泌的影响 如图 10 所示,与对照组比较,模型组细胞上清液中 TNF- α 和 IL-6 水平显著增加 ($P < 0.01$);与模型组比较,各给药组上清液中 TNF- α 和 IL-6 水平显著降低 ($P < 0.01$)。

表 2 油红 O 染色泡沫化细胞相对含量

Table 2 Relative content of foamed cells stained with oil red O

组别	含药血清浓度/%	细胞总数/个	泡沫细胞数/个	泡沫细胞率/%
对照	—	637	38	5.96
模型	—	609	595	97.70 ^{##}
补阳还五汤	10	616	503	81.66 [*]
苷类组分	10.0	618	524	84.79
	5.0	628	500	79.62 [*]
	2.5	643	588	91.45
阿托伐他汀	10	593	430	72.51 ^{**}

与对照组比较: ^{##} $P < 0.01$; 与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$

^{##} $P < 0.01$ vs control group; ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ vs model group

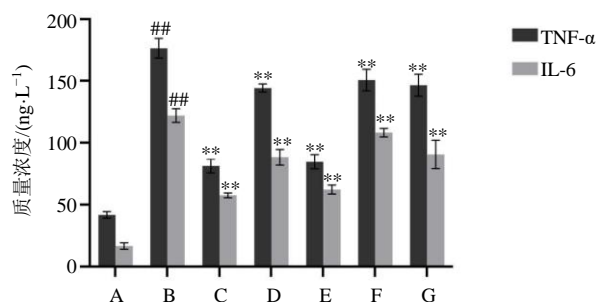


图 10 含药血清对 RAW264.7 细胞上清液中 TNF- α 和 IL-6 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 10 Effect of drug-containing serum on levels of TNF- α and IL-6 in supernatant of RAW264.7 cells ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

2.2.7 含药血清对 RAW264.7 细胞 JAK2、p-JAK2、STAT3 和 p-STAT3 蛋白表达的影响 如图 11 所示, 与对照组比较, 模型组细胞 JAK2、p-JAK2、STAT3 和 p-STAT3 蛋白表达水平均明显增高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 各给药组细胞 JAK2、p-JAK2、STAT3 和 p-STAT3 蛋白表达水平均明显降低 ($P < 0.01$)。

2.2.8 含药血清对 RAW264.7 细胞 JAK2 和 STAT3 mRNA 表达的影响 如图 12 所示, 与对照组相比, 模型组细胞 JAK2 和 STAT3 mRNA 表达水平均显著升高 ($P < 0.01$); 与模型组相比, 各给药组细胞 JAK2 和 STAT3 mRNA 表达水平均显著降低 ($P < 0.01$)。

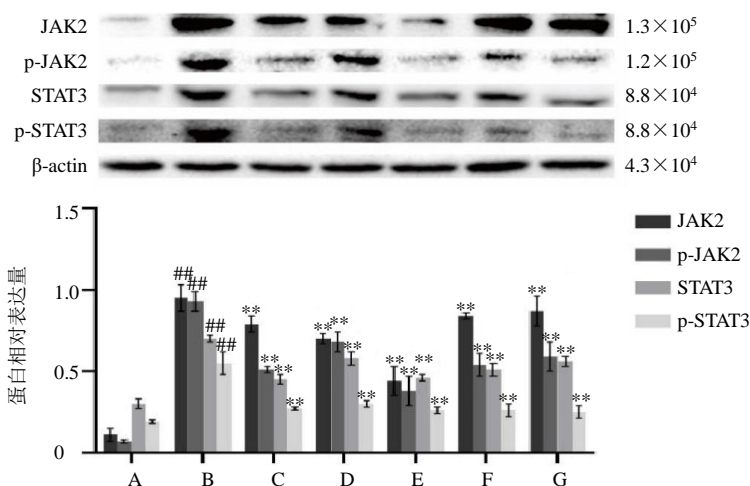


图 11 含药血清对 RAW264.7 细胞 JAK2、p-JAK2、STAT3 和 p-STAT3 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Fig. 11 Effect of drug-containing serum on expressions of JAK2, p-JAK2, STAT3 and p-STAT3 in RAW264.7 cells ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

3 讨论

AS 是导致脑梗死、心肌梗死、冠心病等多种心脑血管疾病的主要病理基础, 脑动脉、主动脉、冠状动脉及外周动脉的血管病变是 AS 的始动因素, 主要特征是泡沫细胞的形成、脂质蓄积和局部血管炎性反应的发生。补阳还五汤及苷类组分 (苦

杏仁苷、芍药苷、黄芪甲苷) 具有抗脑缺血、抗血管内膜增生、抗血管平滑肌增殖等作用^[8,10,13-15]; Liu 等^[3]基于网络药理学研究发现, 补阳还五汤能够通过多组分激活 NF- κ B 通路, 抑制 IL-6 和 TNF- α 表达, 调节脂质代谢, 改善血管内膜, 从而发挥抗 AS 作用。因此, 补阳还五汤或其有效组分与阿托伐他

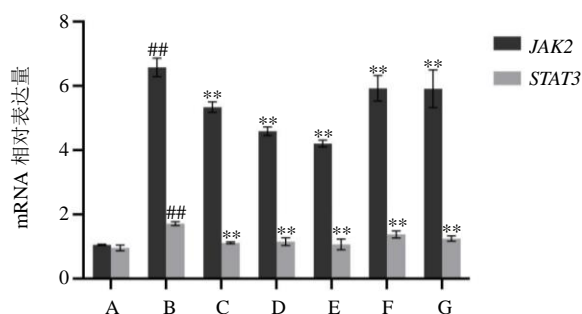


图 12 含药血清对 RAW264.7 细胞 JAK2 和 STAT3 mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Fig. 12 Effect of drug-containing serum on mRNA expressions of JAK2 and STAT3 in RAW264.7 cells ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

汀联用可能具有较好的抗 AS 作用，其作用机制可能与抗炎、调脂稳斑的双重作用有关。本课题组前期研究发现，补阳还五汤苷类有效组分能够抑制增生内膜中细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 的合成，上调增生血管内膜 I 型胶原 (collagen-I, Col-I) 及基质金属蛋白酶 -9 (matrix metalloproteinase-9, MMP-9) 表达，促进 ECM 降解，发挥抗 AS 血管内膜增生的作用。基于此，本研究采用网络药理学方法，研究补阳还五汤主要苷类有效组分与阿托伐他汀治疗 AS 的潜在作用机制，结果显示，补阳还五汤苷类主要组分与阿托伐他汀能够调控 AKT1、VEGFA、STAT3、CASP3 等 65 个靶点，介导 JAK/STAT、缺氧诱导因子-1 (hypoxia inducible factor-1, HIF-1)、TNF 等 78 条信号通路，在 ECM 或膜区，参与炎症反应的调节、白细胞迁移、肌细胞增殖、脂质定位等 17 个生物过程，从而治疗 AS。本研究从生物信息学角度初步证实了补阳还五汤苷类有效组分与阿托伐他汀能够通过多靶点、多通路协同抗 AS，其作用机制可能与调控 JAK/STAT 通路、调节炎症反应及脂质代谢异常有关，为进一步实验验证提供了理论基础和研究方向。

本研究进一步采用 ox-LDL 诱导 RAW264.7 细胞泡沫化，从细胞活力、细胞泡沫化等方面，选取 10% 血清浓度为无细胞毒性的血清浓度，以 75 $\mu\text{g/mL}$ ox-LDL 刺激 RAW264.7 细胞 24 h 为最佳模型，与 Cao 等^[16]用 ox-LDL 诱导 RAW264.7 细胞构建的 AS 模型一致。结果显示，各给药组均能够减少细胞内脂质沉积，降低泡沫化细胞数量，抑制 RAW264.7 细胞吞噬脂质，显著减少细胞内 TC、FC、

CE 含量，补阳还五汤苷类组分中剂量组与阿托伐他汀组疗效相当，提示在调节脂质方面，中剂量补阳还五汤苷类组分与阿托伐他汀联合用药，可以协同发挥调脂稳斑的作用。各给药组均能够抑制 TNF- α 和 IL-6 分泌，补阳还五汤抗炎作用最佳，其次为中剂量补阳还五汤苷类组分，提示在抗炎方面，苷类组分可能为补阳还五汤的主要药效物质，可以作为补阳还五汤原方的精准有效组分替代药物发挥抗炎作用。各给药组均能够抑制 JAK2/STAT3 通路相关蛋白及 mRNA 表达水平，提示补阳还五汤及其苷类有效组分能够通过抑制 JAK2/STAT3 信号通路，在 AS 进程中发挥抗炎和调节脂质的作用。

综上所述，取 10% 血清浓度为无细胞毒性的血清浓度，以 75 $\mu\text{g/mL}$ ox-LDL 刺激 RAW264.7 细胞 24 h 能较好地模拟 AS 疾病模型；补阳还五汤苷类有效组分与阿托伐他汀能够通过多靶点、多通路协同抗 AS，其作用机制可能与抑制 JAK2/STAT3 信号通路，降低细胞内脂质沉积及 TC、FC、CE 含量，抑制炎症因子 TNF- α 、IL-6 的分泌有关；适宜剂量的苷类组分调节脂质代谢方面与阿托伐他汀相当，且抗炎作用优于阿托伐他汀，提示苷类组分有望成为抗 AS 的有效药物。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Yin K, Liao D F, Tang C K. ATP-binding membrane cassette transporter A1 (ABCA1): A possible link between inflammation and reverse cholesterol transport [J]. *Mol Med*, 2010, 16(9/10): 438-449.
- [2] 安冬青, 吴宗贵. 动脉粥样硬化中西医结合诊疗专家共识 [J]. 中国全科医学, 2017, 20(5): 507-511.
- [3] Liu B, Song Z Y, Yu J P, et al. The atherosclerosis-ameliorating effects and molecular mechanisms of BuYangHuanWu decoction [J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 123: 109664.
- [4] 刘玉晖, 侯贝贝, 游宇, 等. 补阳还五汤稳定 ApoE^{-/-}小鼠动脉粥样硬化易损斑块的作用机制 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(15): 112-119.
- [5] 李士明, 吴滢, 徐丽英, 等. 补阳还五汤对 ApoE 基因缺陷小鼠血脂及动脉粥样硬化斑块炎症反应的影响 [J]. 新中医, 2018, 50(2): 5-8.
- [6] 张淑萍, 梁燕, 邓常青. 补阳还五汤和其有效部位对大鼠脑缺血再灌注后 IL-1 β 及相关因子表达的影响 [J]. 湖南中医药大学学报, 2007, 27(2): 24-27.
- [7] 唐映红, 陈瑞芬, 李花, 等. 补阳还五汤有效部位对脑

- 缺血再灌注大鼠 IL-1 β 和 ICAM-1 表达的作用 [J]. 湖南中医学院学报, 2005, 25(5): 5-7.
- [8] 张伟, 贺冰, 李亮, 等. 补阳还五汤促进内皮祖细胞修复损伤血管内皮 [J]. 中国病理生理杂志, 2017, 33(11): 1969-1974.
- [9] Chen G, Wu L, Deng C Q. The effects of BuYang HuanWu Decoction and its effective components on proliferation-related factors and ERK1/2 signal transduction pathway in cultured vascular smooth muscle cells [J]. *J Ethnopharmacol*, 2011, 135(1): 7-14.
- [10] 曹浪, 邓常清. 补阳还五汤苷类有效组分及其有效成分配伍对血管平滑肌细胞增殖及相关信号转导通路的影响 [J]. 中国中药杂志, 2016, 41(10): 1889-1897.
- [11] Paolillo R, Iovene M R, Romano C C, *et al.* Induction of VEGF and MMP-9 expression by toll-like receptor 2/4 in human endothelial cells infected with *Chlamydia pneumoniae* [J]. *Int J Immunopathol Pharmacol*, 2012, 25(2): 377-386.
- [12] Zhong Y, Liu C, Feng J, *et al.* Curcumin affects ox-LDL-induced IL-6, TNF- α , MCP-1 secretion and cholesterol efflux in THP-1 cells by suppressing the TLR4/NF- κ B/miR33a signaling pathway [J]. *Exp Ther Med*, 2020, 20(3): 1856-1870.
- [13] 张伟, 邓常清. 从气血理论探讨病理性血管重构的研究思路 [J]. 中华中医药杂志, 2019, 34(10): 4713-4717.
- [14] 张伟, 刘晓丹, 李亮, 等. 益气活血法和行气活血法修复受损血管内皮的实验研究 [J]. 时珍国医国药, 2014, 25(11): 2792-2793.
- [15] 张伟, 吴露, 陈北阳, 等. 补阳还五汤及有效组分对大鼠增生血管内膜细胞外基质蛋白表达的影响 [J]. 中国病理生理杂志, 2010, 26(1): 169-173.
- [16] Cao H, Jia Q L, Yan L, *et al.* Quercetin suppresses the progression of atherosclerosis by regulating MST1-mediated autophagy in ox-LDL-induced RAW264.7 macrophage foam cells [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(23): E6093.

[责任编辑 李亚楠]