

基于网络药理学、分子对接与实验验证揭示薯蓣皂苷元治疗动脉粥样硬化的作用机制

王 丹^{1,2}, 王肖龙^{1,2*}

1. 上海中医药大学附属曙光医院 国家中医心血管病临床医学研究中心分中心, 上海 201203

2. 上海中医药大学附属曙光医院 心血管病研究所, 上海 201203

摘要: 目的 通过网络药理学、分子对接结合体外验证的方法, 探究薯蓣皂苷元抗动脉粥样硬化 (atherosclerosis, AS) 的潜在靶点及作用机制。方法 通过 SwissTargetPrediction、PharmMapper、ChEMBL 数据库挖掘薯蓣皂苷元作用靶点, 然后通过 OMIM、Drugbank、Genecards、DisGeNET 数据库预测与 AS 相关的靶点, 取两者共同靶点, 构建蛋白质-蛋白质相互作用 (protein-protein interaction, PPI) 网络; 通过 Cytoscape 3.7.2 软件进行可视化, 筛选核心靶点并进行基因本体 (gene ontology, GO) 功能和京都基因和基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 通路富集分析; 使用 AutodockTools、PyMOL 和 Discovery Studio 软件进行分子对接以验证薯蓣皂苷元和靶点的相关性。通过构建体外泡沫细胞模型, 考察薯蓣皂苷元对泡沫细胞脂质代谢、促炎细胞因子水平及关键靶点表达的影响。结果 共获得 588 个薯蓣皂苷元靶点和 5489 个与 AS 相关的靶点, 获得 275 个薯蓣皂苷元与 AS 的交叉靶点, 通过 PPI 网络筛选获得 Src、信号传导及转录激活蛋白 3 (signal transducer and activator of transcription 3, STAT3) 等 52 个关键靶点。GO 功能富集分析表明, 这些靶点主要与蛋白质磷酸化、细胞对脂质的反应, 细胞迁移的正向调节、炎症反应等过程相关。KEGG 通路富集分析发现, 薯蓣皂苷元抗 AS 与脂质和动脉粥样硬化通路、核因子- κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) 信号通路等有关。分子对接表明, 薯蓣皂苷元与 Src、STAT3 具有良好的结合亲和力。体外实验表明, 薯蓣皂苷元显著抑制 THP-1 巨噬细胞脂质堆积和促炎细胞因子水平 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001), 显著下调 Src 和 STAT3 的磷酸化水平 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001)。结论 薯蓣皂苷元能够通过调节多个靶点和通路发挥抗 AS 作用, 其作用机制可能与调节 Src/STAT3 通路从而改善脂质代谢和炎症有关。

关键词: 薯蓣皂苷元; 动脉粥样硬化; 网络药理学; 分子对接; Src; 信号传导及转录激活蛋白 3

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2022)24-7783-12

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.24.016

Mechanism of diosgenin in treatment of atherosclerosis based on network pharmacology, molecular docking and experimental validation

WAND Dan^{1,2}, WANG Xiao-long^{1,2}

1. Branch of National Clinical Research Center for Chinese Medicine Cardiology, Shuguang Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China

2. Cardiovascular Research Institute of Shuguang Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China

Abstract: Objective To explore the potential targets and mechanism of diosgenin against atherosclerosis (AS) through network pharmacology, molecular docking and *in vitro* verification. **Methods** The targets of diosgenin were mined by SwissTargetPrediction, PharmMapper and ChEMBL databases, and then the targets related to AS were predicted by OMIM, Drugbank, Genecards and DisGeNET databases, and protein-protein interaction (PPI) network was constructed by taking the common targets of them. Cytoscape 3.7.2 software was used to visualize, then core targets were screened out and performed gene ontology (GO) function and Kyoto

收稿日期: 2022-09-06

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (81573647); 国家自然科学基金面上项目 (82074222); 上海市中医临床重点实验室 (14DZ2273200); 上海市科委引导类项目 (19401934300); 上海市卫健委中医药事业发展三年行动计划 (ZY[2018-2020]-CCCX-2003-07); 上海市临床重点专科项目 (shslczdk05301)

作者简介: 王 丹 (1994—), 女, 硕士研究生, 研究方向为中西医结合治疗心血管疾病。E-mail: 1055466579@qq.com

***通信作者:** 王肖龙, 博士生导师, 教授。E-mail: wxlqy0214@163.com

encyclopedia of genes and genomes (KEGG) enrichment analysis. AutodockTools, PyMOL and Discovery Studio software were used for molecular docking to verify the correlation between diosgenin and targets. The effects of diosgenin on lipid metabolism, levels of pro-inflammatory cytokines and expressions of key targets in foam cells were investigated by constructing foam cell model *in vitro*.

Results A total of 588 targets of diosgenin and 5489 targets related to AS were obtained, and 275 cross targets between diosgenin and AS were obtained. Through PPI network screening, 52 key targets such as Src, signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) were obtained. GO function enrichment analysis showed that these targets were mainly related to the phosphorylation of protein, reaction of cells to lipids, positive regulation of cell migration, inflammatory reaction and other processes. KEGG pathway enrichment analysis showed that the effect of diosgenin on AS was related to lipid and atherosclerosis pathway, nuclear factor- κ B (NF- κ B) signaling pathway, etc. Molecular docking showed that diosgenin had good binding affinity with Src and STAT3. *In vitro* experiments showed that diosgenin significantly inhibited THP-1 macrophage lipid accumulation and pro-inflammatory cytokine levels ($P < 0.05, 0.01, 0.001$), significantly up-regulated Src and STAT3 phosphorylation levels ($P < 0.05, 0.01, 0.001$). **Conclusion** Diosgenin plays an anti-AS role by regulating multiple targets and pathways, and its mechanism may be related to improving lipid metabolism and inflammation by regulating Src/STAT3 pathway.

Key words: diosgenin; atherosclerosis; network pharmacology; molecular docking; Src; signal transducer and activator of transcription 3

动脉粥样硬化 (atherosclerosis, AS) 是一种发生在大中动脉内膜层的慢性炎症性疾病^[1]。脂质代谢失衡是最初的公认原因, 后来研究发现炎症过程贯穿 AS 的始终。近年来, 研究者逐渐认识到先天性和适应性免疫机制在 AS 进程中的重要作用^[2]。AS 晚期斑块常造成血管狭窄、不稳定斑块破裂以及血栓形成, 引起血管闭塞, 导致致命的心血管疾病, 这也成为老年人死亡最常见的原因之一^[3]。目前临床治疗主要集中于降低低密度脂蛋白胆固醇水平和对并发症进行治疗。尽管目前抗胆固醇合成药物中的他汀类药物及抗血小板药物在 AS 的防治中起到了积极的作用, 但临床应用中还发现了许多不良反应, 例如他汀类药物可引起肌炎、肌痛^[4], 因此有必要开发更多替代药物以扩充临床用药选择。

中药以及从中药中提取的天然化合物由于其高治疗价值、低全身毒性和广泛的药理活性而受到越来越多的关注。薯蓣皂苷元是一种来源于薯蓣属植物 (如盾叶薯蓣、黄山药) 的天然甾体皂苷元^[5], 是地奥心血康、盾叶冠心宁的主要活性成分。地奥心血康、盾叶冠心宁主要用于治疗冠心病、心绞痛、高脂血症等。薯蓣皂苷元与胆固醇具有类似的化学结构, 在肠道中可竞争性地抑制膳食胆固醇吸收^[6-7]、调节脂质代谢^[8-9]、改善高胆固醇血症^[10-11], 同时还具有抗氧化^[12]、抗炎^[13]、抗增殖^[14]等药理作用, 因此有望成为一种新型抗 AS 药物。然而, 目前关于薯蓣皂苷元在 AS 中研究仍处于初级阶段, 其潜在靶点及药理学作用机制有待进一步研究。

网络药理学是一种基于系统生物学发展起来的, 与高通量筛选、下一代测序、多组学应用相关

的新型药物研究范式^[15]。其打破了传统的“一种疾病-一个靶点-一种药物”的思维范式, 通过多靶点、多途径的方式阐述复杂疾病的发病机制^[16-17]。对于多靶点的天然产物未知药理学作用的探索具有积极的预测作用。目前尚无薯蓣皂苷元抗 AS 的网络药理学相关研究, 因此本研究拟通过网络药理学和分子对接技术预测薯蓣皂苷元与潜在靶标之间的相关性, 并通过体外实验对相关靶点和通路进行验证, 以为薯蓣皂苷元抗 AS 的机制研究提供新思路。

1 材料

1.1 细胞

人单核 THP-1 细胞 (批号 20210723A1) 购自大连美仑生物科技有限公司。

1.2 药品与试剂

RPMI 1640 培养基 (批号 AG2957469) 购自美国 HyClone 公司; 薯蓣皂苷元 (质量分数 $\geq 98\%$, 批号 1105F023) 购自北京索莱宝科技有限公司; 阿托伐他汀 (批号 LRAC0148) 购自美国 Sigma 公司; 胎牛血清购自 BI 公司; 氧化低密度脂蛋白 (oxidized low density lipoprotein, ox-LDL, 批号 YB-002) 购自益源生物科技有限公司; 白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、IL-6 ELISA 试剂盒 (批号 EH6306M、EH6281M、EH6513M) 购自上海威奥生物科技有限公司; Src 抗体 (批号 36D10)、磷酸化 Src (Tyr416) 抗体 (批号 D49G4) 购自美国 CST 公司; 信号传导及转录激活蛋白 3 (signal transducer and activator of transcription 3, STAT3) 抗体 (批号 EP2147Y)、 β -actin 抗体 (批号 10021787)

购自美国 Proteintech 公司;磷酸化 STAT3 (Tyr705) 抗体(批号 ab76315) 购自英国 Abcam 公司;油红 O 染液(批号 052821210930)、CCK-8 试剂盒(批号 031921211102) 购自碧云天生物技术有限公司;佛波醇肉豆蔻酸乙酸酯(phorbol 12-myristate 13-acetate, PMA, 批号 P3102110)、山羊抗小鼠 IgG 抗体(批号 P3221170) 购自翌圣生物科技有限公司;山羊抗兔 IgG 抗体(批号 8715) 购自 SAB 公司;胆甾烯酮对照品(质量分数 $\geq 98\%$, 批号 21J040-A3) 购自上海甄准生物科技有限公司;胆固醇氧化酶(批号 J08HS184254)、胆固醇酯酶(批号 M26HS179245)、TritonX-100(批号 A20GS158556)、胆酸钠(批号 1305S11J123719)、无水 $MgCl_2$ (批号 S25O10T100980)、Tri-HCl 缓冲液(批号 N01GR166405) 购自源叶生物科技有限公司。

1.3 仪器

Eclipse E100 型正置光学显微镜(日本尼康公司);DENLEY DRAGON Wellscan MK 型酶标仪、BB5060 型 CO_2 培养箱(美国 Thermo Fisher Scientific 公司);PYX-DHS 型数字显示隔水式电热恒温培养箱(上海跃进医疗器械厂);TGL-168 型离心机(上海安亭科学仪器厂);蛋白电泳系统(美国 Bio-Rad 公司);XW-80A 型漩涡混合器(上海青浦沪西仪器厂);ChemiScope 系列荧光及化学发光成像系统(勤翔科学仪器有限公司);1200 型高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司)。

2 方法

2.1 网络药理学分析

2.1.1 薯蓣皂苷元靶点的预测 通过 SwissTargetPrediction (<http://www.swisstargetprediction.ch>)^[18]、PharmMapper (<http://lilab.ecust.edu.cn/pharmmapper/index.php>)^[19]、ChEMBL (<http://www.ebi.ac.uk/chembl/>)^[20] 数据库进行薯蓣皂苷元靶点预测,所有靶点限定为“human”。去除重复数据后,将预测的靶点输入到 UniProt 数据库(<https://www.uniprot.org/>)中进行标准化。

2.1.2 AS 靶点的预测 在 OMIM 数据库(<https://omim.org/>)^[21-22]、Drugbank 数据库(<https://www.drugbank.ca>)、Genecards 数据库(<https://www.genecards.org/>)和^[23]DisGeNET 数据库(<http://www.disgenet.org/>)^[24] 搜索关键词“atherosclerosis”,预测 AS 相关靶点。

2.1.3 蛋白质-蛋白质相互作用 (protein-protein

interaction, PPI) 网络构建 通过 Venny2.1.0 (<http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/>) 绘制韦恩图,筛选出薯蓣皂苷元和 AS 共同靶点。将这些靶点上传到 STRING 数据库(<https://string-db.org/>)中生成 PPI 网络^[25],将条件设置为“human”,置信度设置为最高置信度(得分值 >0.9)并隐藏网络中断开连接的节点,将得到的 PPI 网络保存为 TSV 文件,导入 Cytoscape 3.7.2 软件构建和可视化靶网,并通过设定度值大于平均值筛选出核心靶点^[26]。

2.1.4 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 通过 Metascape 对交集靶点进行 GO 功能和 KEGG 通路富集分析,选择物种为“human”,分别对生物过程 (biological process, BP)、细胞成分 (cellular component, CC)、分子功能 (molecular function, MF) 和 KEGG 进行富集分析,以获得主要生物学功能和信号通路,筛选 $P < 0.01$ 、最小计数为 3 且富集因子 >1.5 的条目。采用 OmicShare 工具 (<http://www.omicshare.com/tools>) 可视化 KEGG 气泡图。

2.1.5 分子对接 使用 PubChem 数据库 (<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>)^[27] 获得薯蓣皂苷元的 SDF 格式文件,通过 Open Babel GUI 软件转换为“mol2”格式文件,通过 PDB 数据库 (<https://www.rcsb.org/>) 获得核心靶蛋白的 PDB 格式文件,然后使用 Pymol 软件去除所有配体和水分子,并保存为 PDB 格式。通过 Auto Dock Tools 进行对接模拟,采用 PyMOL 2.3.0 和 Discovery Studio 4.5 Client 进行结果处理和可视化^[28]。结合能小于 -20.92 kJ/mol,认为配体和受体蛋白之间对接结果稳定。

2.2 体外实验验证

2.2.1 THP-1 巨噬细胞源性泡沫细胞的培养、模型构建及给药 THP-1 细胞用含 10%胎牛血清、1%青霉素-链霉素的 RPMI 1640 培养基,于 $37^\circ C$ 、5% CO_2 的培养箱中孵育。用 100 ng/mL PMA 孵育 2 d 诱导贴壁巨噬细胞形成,之后用含 100 $\mu g/mL$ ox-LDL 和 0.2%胎牛血清的 RPMI 1640 培养基诱导巨噬细胞分化为泡沫细胞,给予低、中、高剂量 (0.1、1.0、10.0 $\mu mol/L$) 的薯蓣皂苷元或阿托伐他汀 (1 $\mu mol/L$) 干预 48 h,对照组为未经分化的巨噬细胞。

2.2.2 CCK-8 法检测细胞活力 将 THP-1 细胞用

PMA 诱导分化为贴壁巨噬细胞, 以 1×10^5 个/孔接种于 96 孔板中, 每孔加入 100 μL 不同浓度 (0.01、0.1、1、10、20、40、80、160 $\mu\text{mol/L}$) 的薯蓣皂苷元, 对照组加入不含药物的培养基, 培养 48 h 后, 每孔加入 10 μL CCK-8 溶液, 培养箱中孵育 2 h, 采用酶标仪测定 450 nm 处的吸光度 (A) 值。

2.2.3 油红 O 染色评估泡沫细胞形成 将 2 mL THP-1 细胞以 1×10^6 个/mL 接种于 6 孔板中, 按“2.2.1”项下方法诱导泡沫细胞形成, 并给予药物干预 48 h 后, 将细胞于 4% 多聚甲醛中固定 10 min, 用 60% 异丙醇漂洗 15 s; 用油红 O 染液染色 15 min, 用 60% 异丙醇洗涤 10 s; 用苏木精复染细胞 1 min, 用 PBS 洗涤 3 次后, 在倒置显微镜下对阳性染色的细胞 (红色) 进行拍照, 使用 Image-Pro Plus 6.0 软件分析油红染色中脂滴与整个图像面积的面积比进行定量。

2.2.4 HPLC 分析细胞内脂质水平^[29] 按“2.2.3”项下方法处理细胞并给药后, 用 0.1% TritonX-100 裂解细胞, 测定蛋白质浓度后, 用 10 μL 酶促反应混合液 [含 500 mmol/L MgCl_2 、500 mmol/L Tris-HCl、10 mmol/L DTT、5% 胆酸钠] 加入到 100 μL 细胞裂解液中混匀, 然后将胆固醇酯酶联合胆固醇氧化酶加入细胞裂解液中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 各作用 1 h, 用于测定细胞内总胆固醇 (total cholesterol, TC) 含量; 或仅加入胆固醇氧化酶用于测定细胞内游离胆固醇 (free cholesterol, FC) 含量; 最后加入甲醇-乙醇混合液终止反应, 10 000 r/min 离心 15 min, 取 10 μL 上清液用于 HPLC 分析。胆固醇酯 (cholesteryl ester, CE) 含量为 TC 与 FC 的差值。

2.2.5 ELISA 检测细胞上清液中炎性细胞因子水平 按“2.2.3”项下方法处理细胞并给药后, 收集细胞上清液, 按照 ELISA 试剂盒说明书测定上清液中 IL-1 β 、TNF- α 和 IL-6 水平。

2.2.6 Western blotting 检测 Src/STAT3 通路相关蛋白表达 按“2.2.3”项下方法处理细胞并给药后, 收集细胞, 用含或不含磷酸酶抑制剂的 RIPA 缓冲液裂解细胞, 使用 BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度。蛋白样品经 10% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 转至 PVDF 膜, 加入封闭液, 37 $^{\circ}\text{C}$ 封闭 2 h, 分别加入 Src (1:1000)、p-Src (1:1000)、STAT3 (1:500)、p-STAT3 (1:2000)、 β -actin (1:5000) 抗体, 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜; TBST 洗涤 3 次, 每次 5 min, 加入 HRP 标记的山羊抗兔/小鼠 IgG 抗体

(1:5000), 室温孵育 1 h; TBST 洗涤 3 次后, 加入化学发光试剂显影, 采用 ChemiScope Capture 图像分析软件对条带灰度值进行定量分析。

2.2.7 统计分析 使用 GraphPad Prism 7.2 软件进行统计分析, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 使用单因素方差分析进行多组间比较。

3 结果

3.1 薯蓣皂苷元和 AS 的潜在靶点筛选

通过 SwissTargetPrediction、PharmMapper、ChEMBL 数据库分别预测出 100、278、246 个薯蓣皂苷元靶点。去除重复靶点, 共获得 588 个候选靶点。通过 OMIM、Genecards、DisGeNET 和 Drugbank 数据库分别预测出 626、4710、2044、33 个抗 AS 的相关靶点, 去除 1891 重复靶点, 共获得 5489 个与 AS 相关的靶点。

3.2 PPI 网络构建

通过 Omicshare 网站获得 275 个薯蓣皂苷元与 AS 的交叉靶点 (图 1), 将这 275 个靶点导入 String 数据库, 将生成的 PPI 网络导入 Cytoscape 软件, 计算所有节点的拓扑特征并进行可视化。移除 PPI 网络中与主要网络离散且边缘较少的节点后, 最终呈现 191 个靶点、604 条边。根据度值 $\geq 6.324 6$, 鉴定出包括 Src、STAT3 在内的 52 个关键靶点, 如图 2 所示, 颜色越红, 面积越大代表度值越高, 52 个关键靶点分别位于圆圈中心 2 层。

3.3 GO 功能和 KEGG 通路富集分析

对 191 个靶点进行 GO 功能和 KEGG 通路富集分析, 共富集出 198 条分子功能、1818 条生物学过程、111 条细胞成分。图 3 列出了前 20 个 BP、MF、CC 条目 ($P < 0.01$), 结果表明薯蓣皂苷元对 AS 的潜在靶点与蛋白激酶活性、蛋白酪氨酸激酶活性、核受体活性等分子功能有关, 与蛋白质磷酸化、细胞对脂质的反应、细胞迁移的正向调节等生物学过

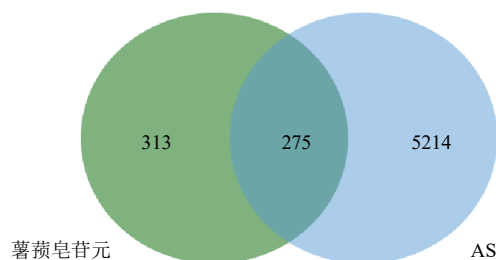
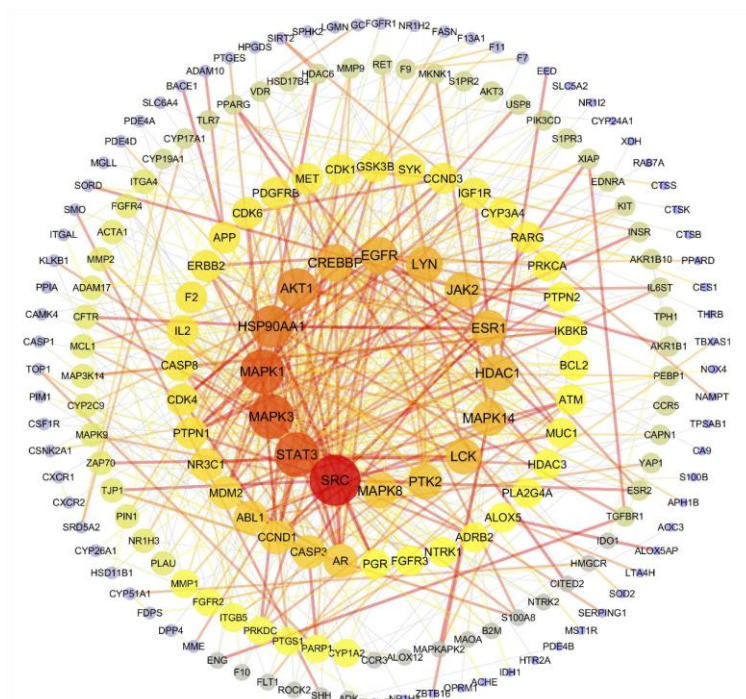


图 1 薯蓣皂苷元治疗 AS 靶点的 Venn 图

Fig. 1 Venn diagram of targets of diosgenin on treating AS



圆点代表靶点，圆点越大越红代表度值越高，圆点越小越紫代表度值越低；连线代表蛋白间的功能关联，连线颜色越深越粗代表关联越强
dots represent target, the larger and redder the dots indicate the higher the degree value, smaller and purplish the dots indicate the lower the degree value;
Lines represent functional associations between proteins, the darker and thicker the line indicate the stronger the connection

图 2 薯蓣皂苷元治疗 AS 的 PPI 网络

Fig. 2 PPI network of diosgenin on treating AS

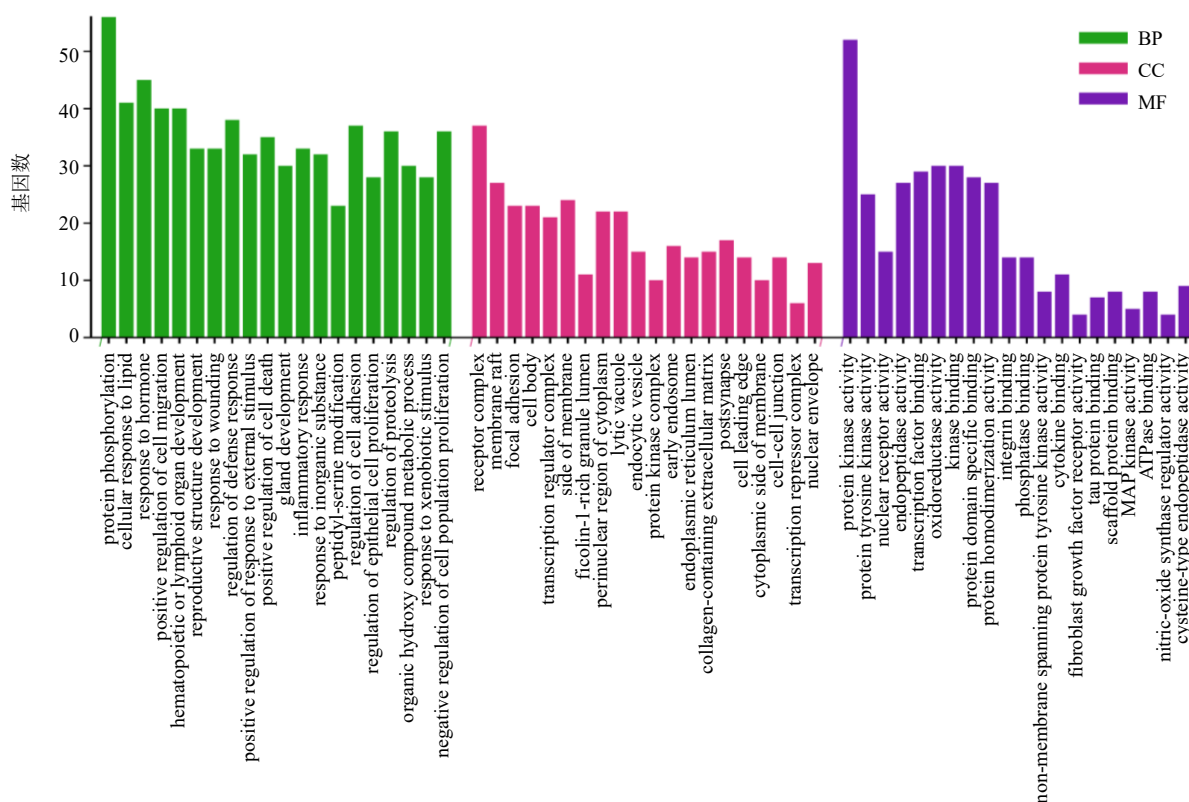


图 3 薯蓣皂苷元治疗 AS 的 GO 功能富集分析 (前 20)

Fig. 3 GO function enrichment analysis of diosgenin on treating AS (top 20)

程有关,与受体复合物、细胞体、膜筏等细胞成分有关。图 4 列出了前 20 条 KEGG 信号通路,去除不相关的广谱通路,KEGG 富集分析显示主要涉及脂质与动脉粥样硬化途径、钙信号通路、核因子- κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) 信号通路等通路。表明

薯蓣皂苷元可能通过调节脂质代谢和炎症对 AS 发挥作用。其中,脂质与动脉粥样硬化途径是一个包含 27 个靶基因的重要途径,涵盖了包括 *Src*、*STAT3* 等众多靶基因(图 5),因此基于 *Src*/STAT3 通路进行后续研究。

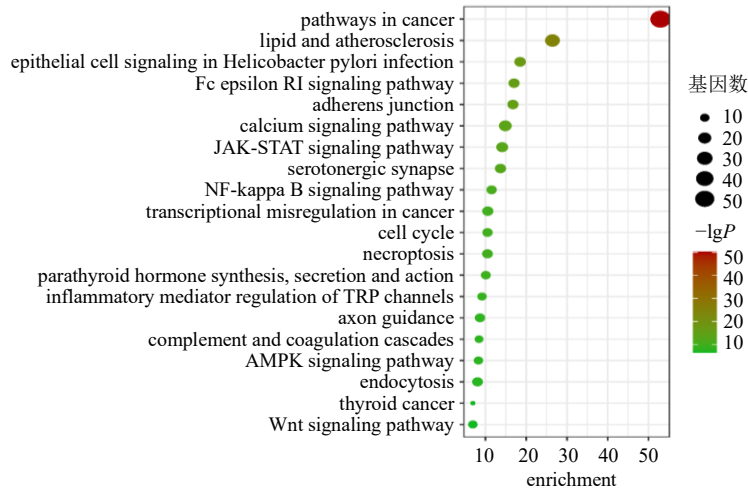


图 4 薯蓣皂苷元治疗 AS 的 KEGG 通路富集分析 (前 20)

Fig. 4 KEGG pathway enrichment analysis of diosgenin on treating AS (top 20)

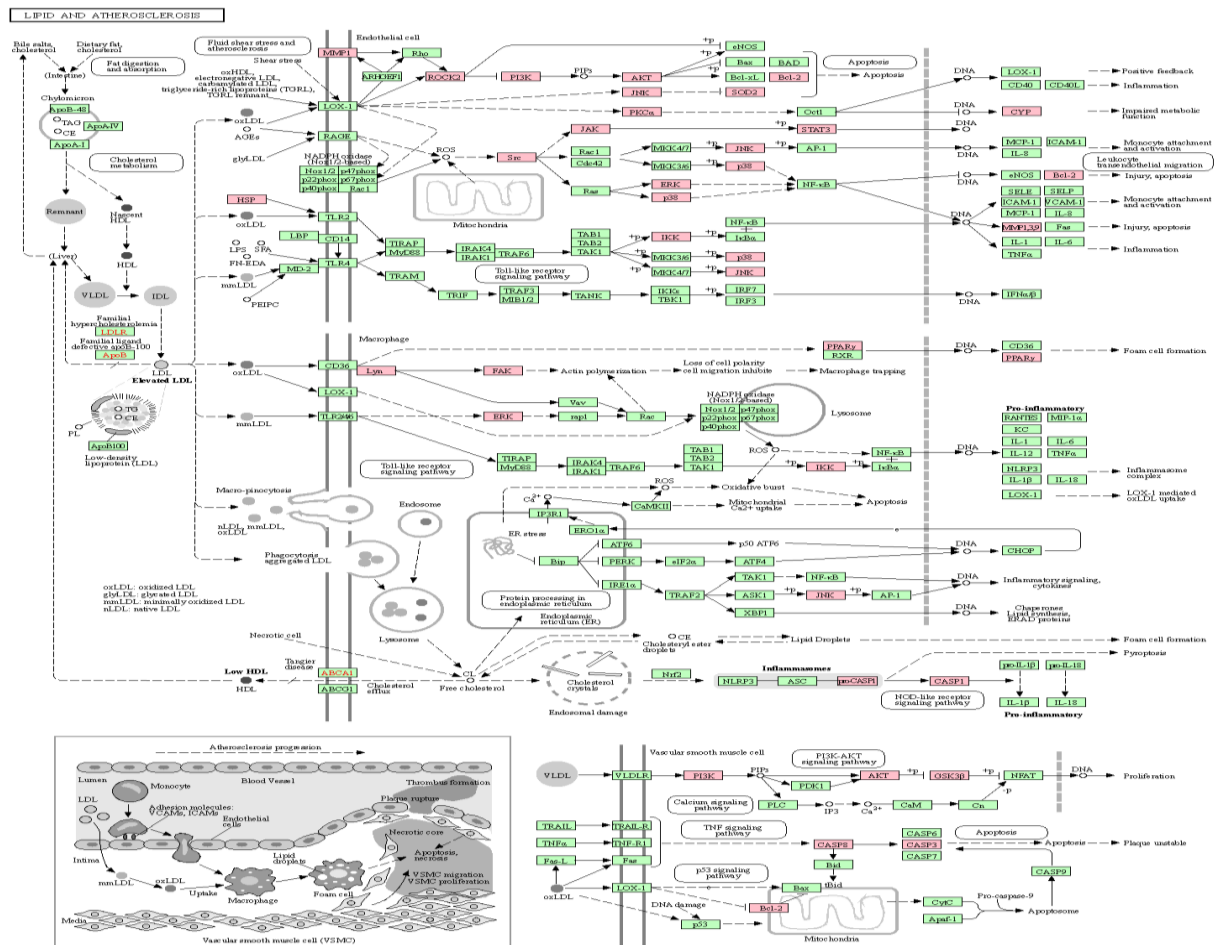


图 5 薯蓣皂苷元参与脂质与动脉粥样硬化途径

Fig. 5 Diosgenin participates in lipid and atherosclerosis pathway

3.4 分子对接分析

如图 6 所示, 薯蓣皂苷元和 Src 的残基 LYS:298 氢键结合有助于结构的稳定, 其次薯蓣皂苷元和 Src 间形成 alkyl 键、Pi-alkyl 键和范德华力作用。薯蓣皂苷元和 STAT3 的残基 ASPA:334 氢键

结合有助于结构的稳定, 其次薯蓣皂苷元和 STAT3 间也形成 alkyl 键、Pi-alkyl 键和范德华力作用。薯蓣皂苷元与 Src、STAT3 的相互作用能分别为 -34.31 、 -34.73 kJ/mol, 均小于 -20.92 kJ/mol, 表明薯蓣皂苷元与 2 个靶点之间具有良好的结合亲和力。

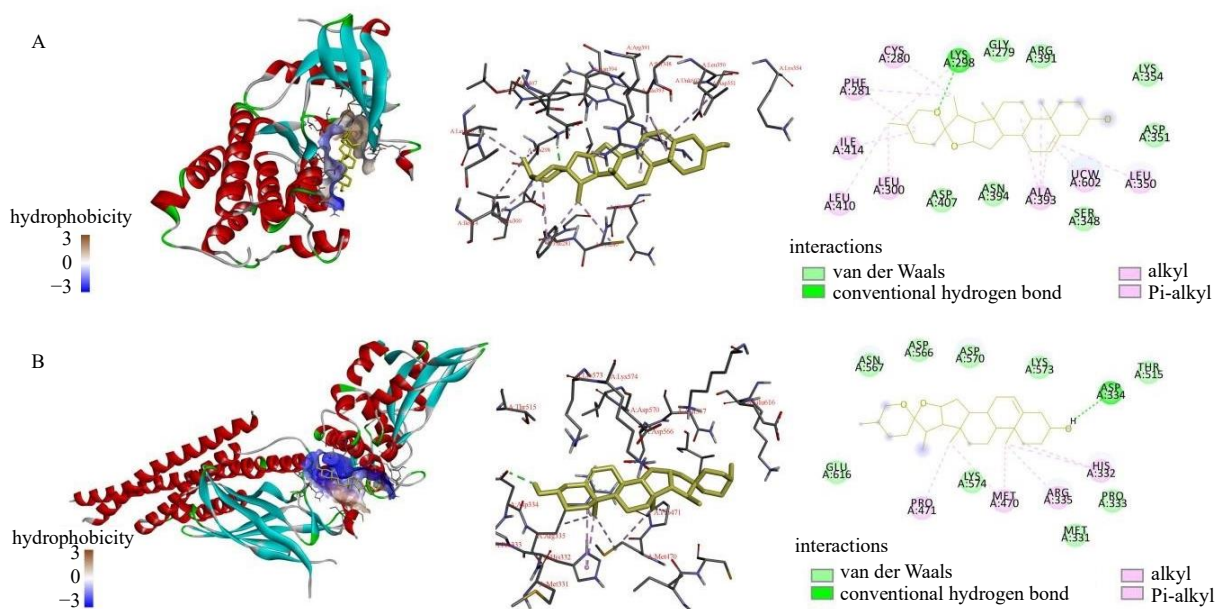


图 6 薯蓣皂苷元与 Src (A) 和 STAT3 (B) 的分子对接结果

Fig. 6 Molecular docking of diosgenin with Src (A) and STAT3 (B)

3.5 体外实验验证结果

3.5.1 薯蓣皂苷元对巨噬细胞活力的影响 如图 7 所示, 当薯蓣皂苷元浓度低于 $20 \mu\text{mol/L}$ 时, 对细胞活性无显著影响; 当薯蓣皂苷元浓度高于 $20 \mu\text{mol/L}$ 时, 呈剂量相关性地抑制细胞活力 ($P < 0.01$ 、 0.001), 因此以 0.1 、 1.0 、 $10.0 \mu\text{mol/L}$ 作为薯蓣皂苷元的低、中、高剂量进行后续实验。

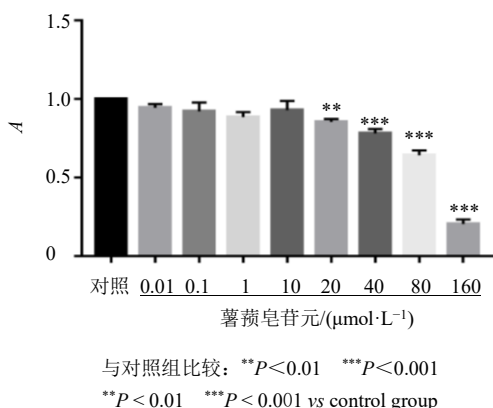


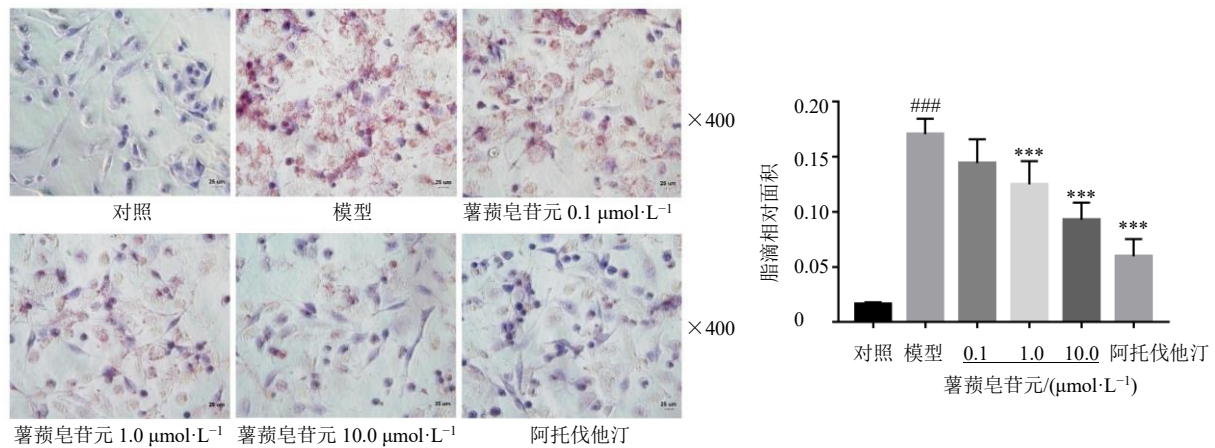
图 7 薯蓣皂苷元对巨噬细胞活力的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Fig. 7 Effect of diosgenin on viability of macrophage ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

3.5.2 薯蓣皂苷元对泡沫细胞形成的影响 如图 8 所示, 与对照组比较, ox-LDL 负载显著增加脂滴染色 ($P < 0.001$), 表明泡沫细胞诱导成功; 与模型组比较, 薯蓣皂苷元中、高剂量组和阿托伐他汀组显著抑制泡沫细胞中脂质的积累 ($P < 0.001$)。

3.5.3 薯蓣皂苷元对 THP-1 巨噬细胞衍生的泡沫细胞 TC、FC 和 CE 水平的影响 如表 1 所示, 与对照组比较, 模型组 TC、FC 和 CE 水平均显著升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 各给药组 TC 和 CE 水平均显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01), 薯蓣皂苷元中、高剂量组和阿托伐他汀组 FC 水平均显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01)。

3.5.4 薯蓣皂苷元对 THP-1 巨噬细胞衍生泡沫细胞上清液中促炎细胞因子水平的影响 如图 9 所示, 与对照组比较, 模型组细胞上清液中 IL-6、IL-1 β 和 TNF- α 水平均显著升高 ($P < 0.001$); 与模型组比较, 各给药组细胞上清液中 TNF- α 水平显著降低 ($P < 0.001$), 薯蓣皂苷元中、高剂量组和阿托伐他汀组细胞上清液中 IL-6 和 IL-1 β 水平均显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001)。



与对照组比较: ^{###} $P < 0.001$; 与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ ^{***} $P < 0.001$, 下图同
^{###} $P < 0.001$ vs control group; ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ ^{***} $P < 0.001$ vs model group, same as below figures

图 8 薯蓣皂苷元对泡沫细胞形成的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 8 Effect of diosgenin on foam cell formation ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

表 1 薯蓣皂苷元对泡沫细胞脂质积累的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 1 Effect of diosgenin on lipid accumulation in foam cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量/($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	TC/($\mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$)	FC/($\mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$)	CE/($\mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$)
对照	—	15.54 ± 1.54	10.93 ± 1.35	4.61 ± 0.68
模型	—	52.69 ± 4.33 ^{##}	21.92 ± 0.85 ^{##}	30.77 ± 4.74 ^{##}
薯蓣皂苷元	0.1	45.72 ± 2.75 [*]	21.93 ± 1.25	23.79 ± 1.70 [*]
	1.0	35.77 ± 1.89 ^{**}	19.07 ± 0.33 [*]	16.70 ± 1.66 [*]
	10.0	31.50 ± 1.59 ^{**}	18.06 ± 0.07 ^{**}	13.44 ± 1.55 ^{**}
阿托伐他汀	1.0	27.24 ± 0.81 ^{**}	16.60 ± 1.43 ^{**}	10.64 ± 0.79 ^{**}

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

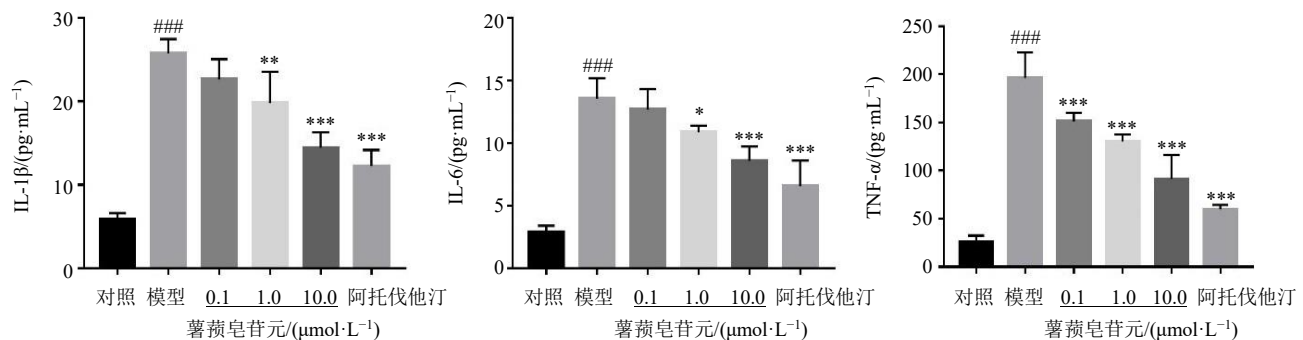


图 9 薯蓣皂苷元对泡沫细胞上清液中 IL-6、IL-1β 和 TNF-α 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 9 Effect of diosgenin on IL-6, IL-1β and TNF-α levels in supernatant of foam cells ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

3.5.5 薯蓣皂苷元对 THP-1 巨噬细胞衍生泡沫细胞中 Src/STAT3 信号通路相关蛋白表达的影响 Src 是 STAT3 信号传导的重要调节剂^[30], Src 激活可触发 STAT3 活性^[31]。此外, ox-LDL 可显著上调大鼠胸主动脉平滑肌 VSMC 细胞中 Src 磷酸化水平, 而沉默 Src 可显著逆转这一效应^[32]。如图 10 所示, 与

对照组比较, 模型组 Src 和 STAT3 的磷酸化水平均显著升高 ($P < 0.001$); 与模型组比较, 各给药组 Src 和 STAT3 的磷酸化水平均显著降低 ($P < 0.05, 0.01, 0.001$)。因此, 薯蓣皂苷元可能通过抑制 Src/STAT3 信号通路, 减轻脂质代谢和促炎细胞因子的分泌, 进而改善 AS。

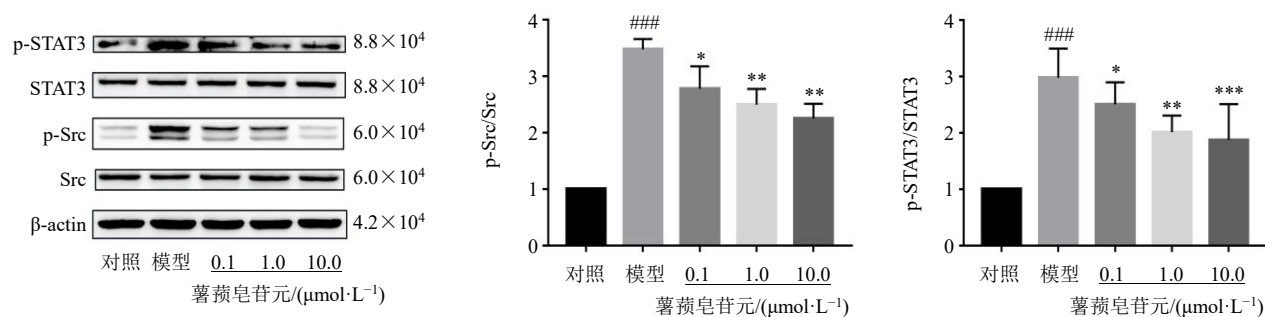


图 10 薯蓣皂苷元对泡沫细胞 Src/STAT3 信号通路相关蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 10 Effect of diosgenin on Src/STAT3 signaling pathway related protein expressions in foam cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

4 讨论

AS 是造成急性冠脉综合征、脑卒中等心脑血管疾病的关键病理基础。薯蓣属植物作为一种药食同源的植物，其毒性极低，产量丰富，价格低廉，并且含有丰富的甾体皂苷，这些甾体皂苷经提取已被制成多种心血管病临床药物。薯蓣皂苷元作为盾叶冠心宁、地奥心血康的最主要的活性成分之一，具有广泛的临床应用价值。薯蓣皂苷元在多种慢性病中发挥重要作用^[33]。研究发现，薯蓣皂苷元可以抑制 AS 小鼠疾病进展^[34]，降低高脂饮食喂养大鼠血清中 TC、三酰甘油、低密度脂蛋白胆固醇和极低密度脂蛋白胆固醇水平，下调 NF- κ B 表达，减轻炎症反应^[35]。薯蓣皂苷元抗 AS 的作用机制尚未被全面揭示。

近年来，网络药理学的兴起无疑为多靶点疾病机制的探讨以及多靶点药物药理作用的探讨提供了一种新的分析工具^[36-37]。本研究通过公开数据库筛选了薯蓣皂苷元和 AS 共同靶点，并构建 PPI 网络以获得核心靶点。通过 GO 功能和 KEGG 通路富集分析探讨薯蓣皂苷元抗 AS 的作用机制。KEGG 分析结果中涉及癌症通路、癌症中的转录失调、甲状腺癌等癌症相关信号通路，推测 Src、STAT3、丝裂原活化蛋白激酶 3 (mitogen-activated protein kinase 3, MAPK3)、蛋白激酶 B1 (protein kinase B1, AKT1) 等多个靶点共同参与癌症与 AS 相关信号通路，并在发病机制上显示出一些相似性，如抑制细胞的增殖与迁移、抑制血管新生、抑制炎症等。在剔除不相关的信号通路后，发现薯蓣皂苷元抗 AS 主要与脂质代谢和炎症相关，涉及脂质与动脉粥样硬化途径、Janus 激酶 (Janus kinase, JAK) -STAT 信号通路、NF- κ B 信号通路等。此外，GO 功能分析表明了薯蓣皂苷元抗 AS 涉及蛋白质磷酸化、细胞对脂

质的反应、细胞迁移的正向调节、炎症反应、细胞黏附的调节、上皮细胞增殖的调节、细胞群增殖的负调控、细胞死亡等生物学过程。提示薯蓣皂苷元可能在脂质代谢、炎症、上皮细胞与血管平滑肌细胞的增殖与迁移、巨噬细胞的迁移与黏附、血管生成、细胞凋亡等 AS 病理环节中发挥重要作用。在筛选的 52 个核心靶点中，Src 与 STAT3 度值最高，同时富集出现在脂质和动脉粥样硬化通路、黏附连接、凋亡、炎症相关信号通路、JAK-STAT 信号通路等 9 条通路中，并且 Src 处于 STAT3 上游。Src 激活可触发 STAT3 活性，促进磷酸化 STAT3 表达^[30]。分子对接结果也表明 Src、STAT3 与薯蓣皂苷元具有较高的结合亲和力。

Src 是一种与迁移相关的非受体酪氨酸激酶，抑制 Src 信号通路可抑制血管平滑肌细胞的增殖和迁移^[38-39]。Src 在调节巨噬细胞功能中发挥重要作用，尤其是巨噬细胞介导的炎症反应和免疫反应。巨噬细胞的黏附迁移和炎症作为 AS 的重要环节，而 Src 参与调节所有 Toll 样受体 (Toll-like receptor, TLR) 家族成员介导的炎症信号通路，表明 Src 在 AS 巨噬细胞炎症中发挥潜在作用^[40]。此外，Src 的激活提供了初始炎症信号，触发了 NF- κ B 介导的炎症途径，NF- κ B 可刺激 IL-6 表达，IL-6 的激活又可促进 STAT3 的激活，以响应炎症信号^[41]。在巨噬细胞脂质代谢中，Src 活性的抑制可减轻巨噬细胞脂质积累^[42]。Src 家族激酶还通过参与解整合素-金属蛋白酶 15 (a disintegrin and metalloproteinase 15, ADAM15) 诱导的内皮屏障功能障碍，减轻 AS^[43]。在肿瘤研究中发现，抑制 Src 可以抑制 STAT3 的激活^[44]。薯蓣皂苷可通过抑制 Src/STAT3 信号通路减少血管生成，在抑制黑色素瘤的生长中发挥重要作用^[45]。薯蓣皂苷是薯蓣皂苷元的糖苷形式，两者具

有相似的效应,推测薯蓣皂苷元对 Src/STAT3 信号通路也有积极的调控作用。

STAT3 是一种重要的核转录因子,在 AS 过程中参与内皮功能障碍、脂质代谢、巨噬细胞极化、炎症调节、血管平滑肌增殖与迁移^[46]。STAT3 抑制剂可抑制 ox-LDL 诱导的巨噬细胞脂质积累,减轻巨噬细胞炎症反应^[47]。在体内和体外实验中,抑制 JAK2/STAT3 通路可降低巨噬细胞内三酰甘油、TC 和低密度脂蛋白胆固醇水平^[48],抑制血管平滑肌细胞增殖,减轻颈动脉内膜厚度^[49]。STAT3 在不稳定斑块中可能也发挥重要作用,抑制 STAT3 可能通过抑制内皮细胞的增殖和迁移,减少血管生成,延缓不稳定斑块的进展^[50]。本研究通过体外诱导泡沫细胞模拟 AS 斑块中泡沫细胞的形成过程,探索薯蓣皂苷元抗 AS 的作用机制,结果显示,薯蓣皂苷元可显著降低 ox-LDL 诱导的巨噬细胞脂质堆积,表现为泡沫细胞脂滴明显减少,TC、CE 和 FC 水平降低,同时炎症因子 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 水平也显著降低;此外,薯蓣皂苷元可抑制 Src 和 STAT3 的磷酸化水平,表明薯蓣皂苷元可能通过抑制 Src/STAT3 信号通路,抑制巨噬细胞脂质堆积和促炎因子表达,改善 AS。

本研究通过网络药理学结合分子对接和体外实验验证,探讨了薯蓣皂苷元治疗 AS 的作用机制。薯蓣皂苷元参与调节多条与 AS 相关的通路,涵盖众多靶点和细胞成分。薯蓣皂苷元可减轻巨噬细胞炎症及脂质堆积,这一效应可能与抑制 Src/STAT3 信号通路有关。本研究拓展了薯蓣皂苷元抗 AS 的机制,为 AS 的治疗和新药研发提供了一种思路。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Weber C, Noels H. Atherosclerosis: Current pathogenesis and therapeutic options [J]. *Nat Med*, 2011, 17(11): 1410-1422.
- [2] Kobiyama K, Ley K. Atherosclerosis [J]. *Circ Res*, 2018, 123(10): 1118-1120.
- [3] Zhu Y H, Xian X M, Wang Z Z, et al. Research progress on the relationship between atherosclerosis and inflammation [J]. *Biomolecules*, 2018, 8(3): E80.
- [4] Tomaszewski M, Stępień K M, Tomaszewska J, et al. Statin-induced myopathies [J]. *Pharmacol Rep*, 2011, 63(4): 859-866.
- [5] Li X F, Liu S L, Qu L P, et al. Dioscin and diosgenin: Insights into their potential protective effects in cardiac diseases [J]. *J Ethnopharmacol*, 2021, 274: 114018.
- [6] Ondevilla J C, Hanashima S, Mukogawa A, et al. Diosgenin-induced physicochemical effects on phospholipid bilayers in comparison with cholesterol [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2021, 36: 127816.
- [7] Laguna J, Gomez-puyou A, Pena A, et al. Effect of diosgenin on cholesterol metabolism [J]. *J Atheroscler Res*, 1962, 2: 459-470.
- [8] Cayen M N, Dvornik D. Effect of diosgenin on lipid metabolism in rats [J]. *J Lipid Res*, 1979, 20(2): 162-174.
- [9] Sun F C, Yang X F, Ma C Q, et al. The effects of diosgenin on hypolipidemia and its underlying mechanism: A review [J]. *Diabetes Metab Syndr Obes*, 2021, 14: 4015-4030.
- [10] Li R Q, Liu Y, Shi J J, et al. Diosgenin regulates cholesterol metabolism in hypercholesterolemic rats by inhibiting NPC1L1 and enhancing ABCG5 and ABCG8 [J]. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*, 2019, 1864(8): 1124-1133.
- [11] Yu L, Lu H F, Yang X F, et al. Diosgenin alleviates hypercholesterolemia via SRB1/CES-1/CYP7A1/FXR pathway in high-fat diet-fed rats [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2021, 412: 115388.
- [12] Jayachandran K S, Vasanthi H R, Rajamanickam G V. Antilipoperoxidative and membrane stabilizing effect of diosgenin, in experimentally induced myocardial infarction [J]. *Mol Cell Biochem*, 2009, 327(1/2): 203-210.
- [13] Choi K W, Park H J, Jung D H, et al. Inhibition of TNF- α -induced adhesion molecule expression by diosgenin in mouse vascular smooth muscle cells via downregulation of the MAPK, Akt and NF- κ B signaling pathways [J]. *Vasc Pharmacol*, 2010, 53(5/6): 273-280.
- [14] Esfandiarei M, Lam J T, Yazdi S A, et al. Diosgenin modulates vascular smooth muscle cell function by regulating cell viability, migration, and calcium homeostasis [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2011, 336(3): 925-939.
- [15] 牛明, 张斯琴, 张博, 等.《网络药理学评价方法指南》解读 [J]. *中草药*, 2021, 52(14): 4119-4129.
- [16] Nogales C, Mamdough Z M, List M, et al. Network pharmacology: Curing causal mechanisms instead of treating symptoms [J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2022, 43(2): 136-150.
- [17] He R P, Jin Z, Ma R Y, et al. Network pharmacology unveils spleen-fortifying effect of *Codonopsis Radix* on different gastric diseases based on theory of “same treatment for different diseases” in traditional Chinese medicine [J]. *Chin Herb Med*, 2021, 13(2): 189-201.
- [18] Daina A, Michielin O, Zoete V. SwissTargetPrediction:

- Updated data and new features for efficient prediction of protein targets of small molecules [J]. *Nucleic Acids Res*, 2019, 47(W1): W357-W364.
- [19] Wang X, Shen Y H, Wang S W, *et al.* PharmMapper 2017 update: A web server for potential drug target identification with a comprehensive target pharmacophore database [J]. *Nucleic Acids Res*, 2017, 45(W1): W356-W360.
- [20] Gaulton A, Hersey A, Nowotka M, *et al.* The ChEMBL database in 2017 [J]. *Nucleic Acids Res*, 2017, 45(D1): D945-D954.
- [21] Amberger J S, Hamosh A. Searching online Mendelian inheritance in man (OMIM): A knowledgebase of human genes and genetic phenotypes [J]. *Curr Protoc Bioinformatics*, 2017, 58: 1-20.
- [22] Amberger J S, Bocchini C A, Schiettecatte F, *et al.* OMIM.org: Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM®), an online catalog of human genes and genetic disorders [J]. *Nucleic Acids Res*, 2015, 43: D789-D798.
- [23] Rebhan M, Chalifa-Caspi V, Prilusky J, *et al.* GeneCards: Integrating information about genes, proteins and diseases [J]. *Trends Genet*, 1997, 13(4): 163.
- [24] Piñero J, Queralt-Rosinach N, Bravo À, *et al.* DisGeNET: A discovery platform for the dynamical exploration of human diseases and their genes [J]. *Database*, 2015, 2015: bav028.
- [25] Szklarczyk D, Morris J H, Cook H, *et al.* The STRING database in 2017: Quality-controlled protein-protein association networks, made broadly accessible [J]. *Nucleic Acids Res*, 2017, 45(D1): D362-D368.
- [26] Shannon P, Markiel A, Ozier O, *et al.* Cytoscape: A software environment for integrated models of biomolecular interaction networks [J]. *Genome Res*, 2003, 13(11): 2498-2504.
- [27] Kim S, Thiessen P A, Bolton E E, *et al.* PubChem substance and compound databases [J]. *Nucleic Acids Res*, 2016, 44(D1): D1202-D1213.
- [28] Seeliger D, de Groot B L. Ligand docking and binding site analysis with PyMOL and Autodock/Vina [J]. *J Comput Aided Mol Des*, 2010, 24(5): 417-422.
- [29] 马卫列, 龚晓华, 李观强, 等. HPLC 法测定 apoA-1 介导的泡沫细胞胆固醇流出的实验研究 [J]. *重庆医学*, 2015, 44(29): 4116-4119.
- [30] Kim M, Morales L D, Jang I S, *et al.* Protein tyrosine phosphatases as potential regulators of STAT3 signaling [J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(9): E2708.
- [31] Zhu J Y, Luo L, Tian L X, *et al.* Aryl hydrocarbon receptor promotes IL-10 expression in inflammatory macrophages through Src-STAT3 signaling pathway [J]. *Front Immunol*, 2018, 9: 2033.
- [32] Zhang W, Zhang L M, Zhang X S. Anti-atherosclerotic effects of genistein in preventing ox-low-density lipoprotein-induced smooth muscle-derived foam cell formation via inhibiting SRC expression and L-Ca channel currents [J]. *Ann Transl Med*, 2022, 10(12): 700.
- [33] Parama D, Boruah M, Yachna K, *et al.* Diosgenin, a steroidal saponin, and its analogs: Effective therapies against different chronic diseases [J]. *Life Sci*, 2020, 260: 118182.
- [34] Lv Y C, Yang J, Yao F, *et al.* Diosgenin inhibits atherosclerosis via suppressing the *miR-19b*-induced downregulation of ATP-binding cassette transporter A1 [J]. *Atherosclerosis*, 2015, 240(1): 80-89.
- [35] Binesh A, Devaraj S N, Devaraj H. Expression of chemokines in macrophage polarization and downregulation of NF-κB in aorta allow macrophage polarization by diosgenin in atherosclerosis [J]. *J Biochem Mol Toxicol*, 2020, 34(2): e22422.
- [36] Hopkins A L. Network pharmacology [J]. *Nat Biotechnol*, 2007, 25(10): 1110-1111.
- [37] Zhang Y Y, Wang Z, Wang Y Y. Multi-hierarchical profiling: An emerging and quantitative approach to characterizing diverse biological networks [J]. *Brief Bioinform*, 2017, 18(1): 57-68.
- [38] Cho H M, Choi S H, Hwang K C, *et al.* The Src/PLC/PKC/MEK/ERK signaling pathway is involved in aortic smooth muscle cell proliferation induced by glycated LDL [J]. *Mol Cells*, 2005, 19(1): 60-66.
- [39] Lang Y S, Chen D, Li D Y, *et al.* Luteolin inhibited hydrogen peroxide-induced vascular smooth muscle cells proliferation and migration by suppressing the Src and Akt signalling pathways [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2012, 64(4): 597-603.
- [40] Byeon S E, Yi Y S, Oh J, *et al.* The role of Src kinase in macrophage-mediated inflammatory responses [J]. *Mediators Inflamm*, 2012, 2012: 512926.
- [41] Iliopoulos D, Hirsch H A, Struhl K. An epigenetic switch involving NF-kappaB, Lin28, Let-7 microRNA, and IL6 links inflammation to cell transformation [J]. *Cell*, 2009, 139(4): 693-706.
- [42] Yang K, Wang X Q, Liu Z H, *et al.* Oxidized low-density lipoprotein promotes macrophage lipid accumulation via the toll-like receptor 4-Src pathway [J]. *Circ J*, 2015, 79(11): 2509-2516.
- [43] Sun C X, Wu M H, Lee E S, *et al.* A disintegrin and metalloproteinase 15 contributes to atherosclerosis by mediating endothelial barrier dysfunction via Src family

- kinase activity [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2012, 32(10): 2444-2451.
- [44] Giordano M, Decio A, Battistini C, *et al*. L1CAM promotes ovarian cancer stemness and tumor initiation via FGFR1/SRC/STAT3 signaling [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2021, 40(1): 319.
- [45] Liu Y X, Xu B W, Niu X D, *et al*. Inhibition of Src/STAT3 signaling-mediated angiogenesis is involved in the anti-melanoma effects of dioscin [J]. *Pharmacol Res*, 2022, 175: 105983.
- [46] Chen Q, Lv J J, Yang W W, *et al*. Targeted inhibition of STAT3 as a potential treatment strategy for atherosclerosis [J]. *Theranostics*, 2019, 9(22): 6424-6442.
- [47] Wang R, Zhang Y J, Xu L R, *et al*. Protein inhibitor of activated STAT3 suppresses oxidized LDL-induced cell responses during atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 36790.
- [48] Yang L W, Song Z K, Pan Y, *et al*. PM2.5 promoted lipid accumulation in macrophage via inhibiting JAK2/STAT3 signaling pathways and aggravating the inflammatory reaction [J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2021, 226: 112872.
- [49] Song H T, Cui Y, Zhang L L, *et al*. Ruxolitinib attenuates intimal hyperplasia via inhibiting JAK2/STAT3 signaling pathway activation induced by PDGF-BB in vascular smooth muscle cells [J]. *Microvasc Res*, 2020, 132: 104060.
- [50] Li S F, Geng Q, Chen H, *et al*. The potential inhibitory effects of *miR19b* on vulnerable plaque formation via the suppression of STAT3 transcriptional activity [J]. *Int J Mol Med*, 2018, 41(2): 859-867.

[责任编辑 李亚楠]