

基于网络药理学和分子对接探究地骨皮调血脂的作用机制

赵少磊^{1,2}, 原震², 朱艳茹^{1,2}, 丁浩强², 郑鑫杰², 张静泽^{1,2}, 刘岱琳^{1,2*}

1. 天津中医药大学, 天津 301617

2. 天津现代创新中药科技有限公司, 天津 300384

摘要: **目的** 基于网络药理学与分子对接技术探讨地骨皮调血脂的作用机制。**方法** 使用 TCMSP 数据库并查阅相关文献确定地骨皮活性成分; 采用 SwissTargetPrediction、GeneCard 和 OMIM 数据库预测地骨皮活性成分靶点和高脂血症相关靶点, 应用 Venny 2.1 取两者交集; 运用 Cytoscape 3.8.2 软件绘制成分-靶点-疾病网络; 应用 String 数据库构建交集靶点的蛋白质-蛋白质相互作用 (protein-protein interaction, PPI) 网络; 将交集靶点输入 Metascape 数据库进行基因本体 (gene ontology, GO) 功能及京都基因与基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 通路富集分析, 利用 Cytoscape 3.8.2 软件绘制地骨皮活性成分-靶点-通路网络, 预测其调血脂作用机制; 采用分子对接和细胞实验进一步探究地骨皮的调血脂作用机制。**结果** 共筛选出地骨皮潜在活性成分 14 个以及 153 个交集靶点; GO 功能和 KEGG 通路分析发现主要涉及过氧化物酶体增殖物激活受体 (peroxisome proliferator activated receptor, PPAR) 信号通路、AMP 激活的蛋白激酶 (AMP-activated protein kinase, AMPK) 信号通路、脂质和动脉粥样硬化、胰岛素抵抗、脂肪消化吸收以及胆汁分泌等。分子对接结果显示, 地骨皮中金合欢素、蒙花苷、 β -谷甾醇以及大黄素等活性成分与关键靶蛋白之间具有良好的结合作用。细胞实验结果显示, 蒙花苷、 β -谷甾醇以及大黄素均能够抑制油酸诱导的人肝癌 HepG2 细胞脂质蓄积 ($P < 0.05$ 、 0.01)。Western blotting 实验结果显示, 蒙花苷和大黄素均能上调人结肠腺癌 Caco-2 细胞中腺苷三磷酸结合盒转运蛋白 A1 (ATP binding cassette transport protein A1, ABCA1) 蛋白表达 ($P < 0.05$ 、 0.01)。**结论** 地骨皮中的蒙花苷、大黄素、 β -谷甾醇等活性成分可能是通过作用于 PPAR α 、PPAR γ 等靶点干预 PPAR 和 AMPK 等信号通路, 影响下游蛋白 ABCA1 的表达, 抑制细胞中的脂质蓄积从而发挥调血脂作用。

关键词: 地骨皮; 调血脂; 网络药理学; 分子对接; 蒙花苷; 大黄素; β -谷甾醇; 金合欢素; 氧化物酶体增殖物激活受体
中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2023)05-1487-11

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.05.015

Mechanism of hypolipidemic effect of *Lycii Cortex* based on network pharmacology and molecular docking

ZHAO Shao-lei^{1,2}, YUAN Zhen², ZHU Yan-ru¹, DING Hao-qiang², ZHENG Xin-jie², ZHANG Jing-ze^{1,2}, LIU Dai-lin^{1,2}

1. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617, China

2. Modern TCM Innovation Center, Tianjin 300384, China

Abstract: **Objective** To explore the mechanism of hypolipidemic effect of Digupi (*Lycii Cortex*) based on network pharmacology and molecular docking technology. **Methods** The active ingredients were determined by Using TCMSP database and browsing literatures. SwissTargetPrediction, GeneCard and OMIM databases were used to predict the active component targets of *Lycii Cortex* and hyperlipidemia-related targets, and Venny 2.1 was used to obtain intersection targets. Cytoscape 3.8.2 software was used to map the component-intersection targets-disease network. Protein-protein interaction (PPI) network with intersecting targets was constructed by String database. The intersection targets were input into Metascape databases for gene ontology (GO) function and Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) pathway enrichment analysis to predict its possible hypolipidemic mechanism, the diagram of components-intersection target-pathway of *Lycii Cortex* were showing by Cytoscape 3.8.2 software. Molecular docking

收稿日期: 2022-10-10

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81673693); 中药抗炎机制与智能制造研究创新能力建设项目 (20201178)

作者简介: 赵少磊 (1997—), 男, 硕士研究生, 主要从事中药作用物质基础研究。

*通信作者: 刘岱琳 (1973—), 女, 教授, 主要从事中药作用物质基础研究。Tel: 13821660597 E-mail: dailinlch1977@163.com

and cell experiments were used to further explore the hypolipidemic mechanism of *Lycii Cortex*. **Results** A total of 14 potential active components and 153 intersecting targets were obtained from *Lycii Cortex*. GO function and KEGG pathway analysis showed that the key targets involved AMP-activated protein kinase (AMPK) signaling pathway, peroxisome proliferator activated receptor (PPAR) signaling pathway, lipid and atherosclerosis, insulin resistance, fat digestion and absorption, bile secretion, etc. The molecular docking results showed that the active components of acacetin, linarin, β -sitosterol and emodin displayed strong binding abilities with key targets respectively. In addition, results of cell experiments *in vitro* showed that linarin, β -sitosterol and emodin could inhibit lipid accumulation in oleic acid-induced HepG2 cells ($P < 0.05, 0.01$). Western blotting experiments results showed that linarin and emodin could increase ATP binding cassette transport protein A1 (ABCA1) protein expression in Caco-2 cells ($P < 0.05, 0.01$). **Conclusion** The active components in *Lycii Cortex* such as linarin, emodin and β -sitosterol may act on PPAR α , PPAR γ and other targets, inhibit the lipid accumulation, increase the expression of ABCA1 through PPAR signaling pathway, AMPK signaling pathway and other related pathways, thereby exerting a hypolipidemic effect.

Key words: *Lycii Cortex*; hypolipidemic; network pharmacology; molecular docking; linarin; emodin; β -sitosterol; acacetin; peroxisome proliferator activated receptor

近年来,脂质代谢异常已经成为仅次于高血压、吸烟的第 3 大心血管疾病独立危险因素^[1],高脂血症与心血管事件的发生密切相关。低密度脂蛋白胆固醇升高是心血管疾病尤其是冠状动脉粥样硬化性心血管疾病的重要危险因素,因此,调节血脂对于防治心血管疾病、降低心血管事件的发生具有重要意义。中药以其疗效确切、不良反应小以及多途径、多靶点的作用特点在调节血脂异常、防治高脂血症方面具有良好的前景。

地骨皮为茄科植物枸杞 *Lycium chinense* Mill.或宁夏枸杞 *L. barbarum* L.的干燥根皮。《本草纲目》中曾记载“春采枸杞叶,名天精草;夏采花,名长生花;秋采子,名枸杞子;冬采根,名地骨皮”。果实枸杞为药食同源的常用中药材,始载于《神农本草经》,具有可滋补肝肾、益精明目的功效,用于治疗虚劳精亏、腰膝酸痛、眩晕耳鸣、阳痿遗精、内热消渴、血虚萎黄、目昏不明等症^[2]。枸杞的根皮名为地骨皮,可凉血除蒸、清肺降火,用于治疗阴虚潮热、骨蒸盗汗、肺热咳嗽、咯血、衄血、内热消渴等症^[3]。现代药理学研究发现,地骨皮具有降血压、调血脂、降血糖、抗骨质疏松、抗炎等多种作用^[4]。研究发现,地骨皮中的蒽醌类成分能够降低高脂血症大鼠总胆固醇、三酰甘油和低密度脂蛋白胆固醇水平,增加胆汁酸的外排,从而发挥调血脂作用^[5-6]。地骨皮含有环肽类、黄酮、蒽醌、生物碱、多糖等多种活性成分,但是其调血脂活性成分及作用机制研究报道相对较少。因此,本研究借助网络药理学方法^[7],通过基因、靶蛋白、疾病以及药物等数据库,结合系统生物学、多向药理学以及计算机生物学分析并构建地骨皮调血脂的潜在活性成分、

靶点、疾病以及通路相互作用网络,并通过分子对接和细胞实验进一步验证,为揭示地骨皮的调血脂机制提供参考。

1 材料

1.1 细胞

人肝癌 HepG2 细胞由武警后勤学院军事药学院教研室提供,人结肠腺癌 Caco-2 细胞购自普诺赛生命科技有限公司。

1.2 药品与试剂

β -谷甾醇(批号 MUST1310515)、大黄素(批号 MUST13022715)、金合欢素(批号 MUST1305235)、蒙花苷(批号 MUST1320153)购自成都曼思特生物科技有限公司,质量分数均大于 98%;脂多糖(lipopolysaccharide, LPS, 批号 059M4031V)购自美国 Sigma 公司;胎牛血清(批号 12B031)购自 Excell Bio 公司;青霉素-链霉素(批号 WH1021A161)、胰蛋白酶(批号 WH2122Z111)、DMEM 培养基(批号 WH0022Z121)购自普诺赛生命科技有限公司;油酸(批号 C13292586)购自麦克林生化科技有限公司;辛伐他汀(批号 L2103127)购自阿拉丁生化试剂有限公司;腺苷三磷酸结合盒转运蛋白 A1(ATP binding cassette transport protein A1, ABCA1)抗体(批号 27U4953)、 β -actin 抗体(批号 12W2944)购自 Affinity 公司;HRP 标记的山羊抗兔 IgG 抗体(批号 CR2108180)购自赛维尔生物科技有限公司;油红 O 染色试剂盒(批号 20220704)、CCK-8 检测试剂盒(批号 316R012)、BCA 蛋白检测试剂盒(批号 20220705)购自索莱宝科技有限公司;增强化学发光试剂盒(批号 AK060P081896)购自伊莱瑞特

生物科技股份有限公司。

1.3 仪器

Thermo 371 型 CO₂ 培养箱、Thermo-R 型离心机、1300SA2 型生物安全柜、Multiskan GO1510 型酶标仪 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司); Dmi1 型倒置生物显微镜 (德国 Leica 公司); AI680RGB 型凝胶成像仪 (美国 GE 公司)。

2 方法

2.1 分子网络构建

2.1.1 地骨皮化学成分及对应靶点的筛选 在 TCMSP (<https://old.tcmsp-e.com/tcmsp.php>) 数据库以“地骨皮”为关键词检索化学成分, 将地骨皮按照吸收、分布、代谢、排泄 (absorption, distribution, metabolism, excretion, ADME) 过程筛选潜在活性成分, 以口服利用度 (oral bioavailability, OB) $\geq 30\%$ 和类药性 (drug-likeness, DL) ≥ 0.18 为条件建立相应的综合模型收集相应的化学成分及其对应的靶点蛋白。同时通过查阅相关文献^[26]补充活性成分以构建地骨皮活性成分数据库。运用 PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) 数据库下载化合物的 2D 结构, 导入到 SwissTargetPrediction (<http://www.swisstargetprediction.ch/>) 数据库, 设置属性为“Homo sapiens”, 点击“Predict Targets”, 预测相应的靶点, 去除可能性为零的相关靶点, 并将数据合并去重。

2.1.2 高脂血症疾病靶点数据库的构建 以“hyperlipidemia”为关键词在 GeneCards (<https://www.genecards.org/>) 和 OMIM (<https://www.omim.org/>) 数据库中对相关的疾病靶点进行检索, 之后进行数据合并及去重以构建高脂血症疾病靶点数据库。

2.1.3 活性成分和疾病共同靶点的筛选 通过 Uniprot (<https://www.uniprot.org/>) 数据库将物种设定为 Human, 确定靶点蛋白的基因名称, 随后利用 Venny 2.1 对地骨皮中的活性成分和疾病的靶点取交集, 得到活性成分和疾病的交集靶点。

2.1.4 蛋白质-蛋白质相互作用 (protein-protein interaction, PPI) 网络的构建 为明确地骨皮活性成分相关蛋白与疾病靶点的相关作用, 获取地骨皮调血脂的潜在作用靶点, 将交集靶点导入到 String (<https://string-db.org/>) 数据库^[8]中, 构建 PPI 网络模型。将生物物种设定为“Homo sapiens”, 将置信度设置为最高置信度“highest confidence (0.9)”, 其余设置均为默认, 获取 PPI 关键靶点。将结果进一步

导入 Cytoscape 3.8.2 软件中进行可视化处理, 设置参数使节点大小和颜色深浅反映度值的大小, 边的粗细反映结合率评分的高低, 构建 PPI 网络图。

2.1.5 地骨皮活性成分-靶点-疾病网络图的构建 将筛选出的活性成分靶点以及疾病靶点输入到 Venny 2.1 (<https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>) 中得到交集韦恩图^[9]。结合 Cytoscape 3.8.2 软件构建活性成分-靶点-疾病网络图以及网络拓扑学分析。

2.1.6 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 将地骨皮与调血脂的核心作用靶点录入 Metascape (<http://metascape.org/>) 数据库进行分析, 物种设置“Homo sapiens”, 设置阈值“ $P < 0.01$ ”, 进行 GO 功能及 KEGG 通路富集分析, 分析其主要的生物学过程与相关通路, 之后运用 Cytoscape 3.8.2 软件进行成分-靶点-通路网络图的构建以及可视化处理。

2.1.7 分子对接 为了更好地阐述地骨皮发挥调血脂作用的潜在靶点和对应活性成分之间的结合活性, 根据上述筛选出的活性成分和核心靶点, 结合临床药理实验及大量调血脂相关文献报道, 选取过氧化物酶体增殖物激活受体 (peroxisome proliferator activated receptor, PPAR) 通路中的 2 个靶点作为研究对象, 利用 ChemBioDraw Ultra 软件绘制筛选得到的 14 个单体化合物的结构, 并用 Chem 3D 软件获取所有单体化合物 3D 格式的结构式。在 RCSB PDB 数据库中下载关键蛋白靶点 PPAR α 和 PPAR γ 的配体, 尽量选择分辨率高、有配体、结构相对完整的晶体结构, 并下载 PDB 格式文件。应用 SYBYL-X 2.0 软件对化合物和蛋白靶点进行分子对接, 并利用其自带的打分函数对对接结果进行模拟筛选, 获得总得分值, 总得分 ≥ 5 表明受体和配体亲和力较大。之后利用 Discovery Studio 2019 Client 软件对结果进行可视化处理。

2.2 细胞实验

2.2.1 HepG2 细胞和 Caco-2 细胞培养 HepG2 细胞用含 10% 胎牛血清、1% 青霉素-链霉素的 DMEM 培养基, 于 37 °C、5% CO₂ 的恒温培养箱中培养。Caco-2 细胞用含 20% 胎牛血清、1% 青霉素-链霉素的 DMEM 培养基, 于 37 °C、5% CO₂ 的恒温培养箱中培养。每隔 2 d 更换 1 次培养液, 当细胞融合度为 80% 时用胰蛋白酶消化传代。

2.2.2 细胞活力测定 分别精密称取 β -谷甾醇、蒙花苷、大黄素和金合欢素适量,用二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)溶液完全溶解,配制成浓度为 0.01 mol/L 的各样品药液,使用时用含 10%胎牛血清的 DMEM 完全培养基稀释成不同浓度。HepG2 细胞以 1×10^4 个/孔接种于 96 孔板中,培养 24 h 后,与 500 μ mol/L 油酸和 20 μ mol/L 辛伐他汀以及不同浓度(0、25、50、100、200 μ mol/L) β -谷甾醇、蒙花苷、大黄素和金合欢素分别培养 24 h,另设置空白孔(不含细胞),每孔加入 10 μ L CCK-8 试剂,孵育 2 h,使用酶标仪于 450 nm 处测定吸光度(A)值,计算细胞存活率,并筛选出最适药物浓度。

Caco-2 细胞以 1×10^4 个/孔接种于 96 孔板中,培养 24 h 后,与不同浓度(0、25、50、100、200 μ mol/L)蒙花苷和大黄素分别培养 24 h 后,每孔加入 10 μ L CCK-8 试剂,孵育 2 h,使用酶标仪于 450 nm 处测定 A 值,计算细胞存活率,并筛选出最适药物浓度。

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

2.2.3 油红 O 染色 HepG2 细胞以 2×10^4 个/孔接种于 96 孔,培养 24 h 后,设置对照组、模型组、辛伐他汀(20 μ mol/L)组、 β -谷甾醇(100 μ mol/L)组、蒙花苷(100 μ mol/L)组、大黄素(50 μ mol/L)组和金合欢素(100 μ mol/L)组。除对照组外,其余各组加入 500 μ mol/L 油酸,各给药组另加入相应药物培养 24 h 后,根据油红 O 染色试剂盒说明书进行染色,蒸馏水清洗 3 次,于显微镜下观察细胞脂滴,采用 Image J 6.0 软件分析细胞脂滴含量。

2.2.4 Western blotting 分析 Caco-2 细胞以 5×10^4 个/孔接种于 6 孔板中,培养 24 h 后,设置对照组(以不含胎牛血清的培养基培养)、模型组(以含 20%胎牛血清的培养基培养)、蒙花苷组(以含 100 μ mol/L 蒙花苷的培养基培养)和大黄素组(以含 50 μ mol/L 大黄素的培养基培养),加入药物培养 24 h 后用高效 RIPA 组织/细胞快速裂解液提取细胞总蛋白,并使用 BCA 蛋白检测试剂盒进行定量。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,加入脱脂牛奶,室温封闭 2 h,分别加入 ABCA1 抗体(1:500)和 β -actin 抗体(1:1000),4 $^{\circ}$ C 孵育过夜;TBST 洗涤 3 次,每次 10 min,加入二抗,室温孵育 2 h;TBST 洗涤 3 次,每次 10 min,使用增强化学发光试剂盒检测蛋白条带,采用

Image J 6.0 软件分析条带灰度值。

2.2.5 统计学分析 采用 Image J 6.0 和 GraphPad Prism 8.0 软件进行统计学分析,实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。对数据进行单因素方差分析,并使用检验进行组间比较。

3 结果

3.1 地骨皮活性成分的筛选

通过 TCMSP 数据库查找,得到地骨皮有效成分 37 个,根据 $OB \geq 30\%$ 和 $DL \geq 0.18$ 进行筛选,同时查阅相关文献,最终获得地骨皮中调血脂的潜在活性成分 14 个(表 1)。

表 1 地骨皮的潜在活性成分

Table 1 Potential active components of *Lycii Cortex*

序号	MOL ID	活性成分	OB/%	DL
1	MOL001552	莨菪碱	45.97	0.19
2	MOL001645	醋酸芳樟酯	42.10	0.20
3	MOL001689	金合欢素	34.97	0.24
4	MOL001790	蒙花苷	39.84	0.71
5	MOL002218	东莨菪苷	56.45	0.39
6	MOL002219	阿托品	34.53	0.21
7	MOL002222	柳杉酚	36.11	0.28
8	MOL002224	金色酰胺醇酯	58.38	0.59
9	MOL002228	苦楝萜酮内酯	45.44	0.82
10	MOL000296	常春藤皂苷元	36.91	0.75
11	MOL000358	β -谷甾醇	36.91	0.75
12	MOL000449	豆甾醇	43.83	0.76
13	MOL000953	胆甾醇	37.87	0.68
14	MOL000472	大黄素	24.40	0.24

3.2 成分靶点、疾病靶点以及交集靶点的筛选

将 TCMSP 和 SwissTargetPrediction 数据库得到的活性成分靶点合并去重后共得到 393 个活性成分靶点,依据 GeneCards 和 OMIM 数据库中对相关的疾病靶点检索结果,进行数据合并及去重后得到 1486 个靶点,之后将筛选出的成分靶点和疾病靶点输入 Venny 2.1 取交集(图 1),得到 153 个交集靶点,作为药物作用于疾病的预测靶点。

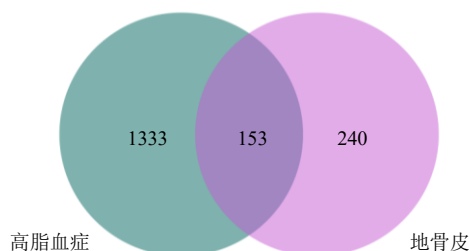


图 1 地骨皮成分靶点与疾病靶点的 Venn 图

Fig. 1 Venn diagram of component targets and disease targets of *Lycii Cortex*

3.3 PPI 网络的构建

将得到的 153 个药物和疾病交集靶点导入到 String 数据库中, 设置相互作用得分为最高 0.9, 剔除未参与蛋白互作的靶点, 从而得到 PPI 网络。将得到的数据导入到 Cytoscape 3.8.2 软件中进行进一步处理和分析见图 2, 活性成分和靶点均以节点表示, 相互关系则以边表示。

3.4 成分-靶点-疾病网络的构建

将活性成分和疾病靶点筛选得到的交集靶点导入到 Cytoscape 3.8.2 软件中, 构建成分-交集靶点-疾病网络 (图 3), 活性成分、靶点以及疾病均以节点表示, 相互关系则以边表示。之后进行拓扑学分析,

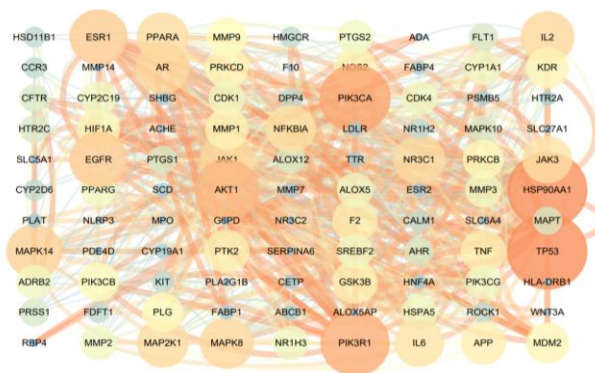


图 2 活性成分与疾病交集靶点的 PPI 网络

Fig. 2 PPI network of intersection targets of active ingredient and disease

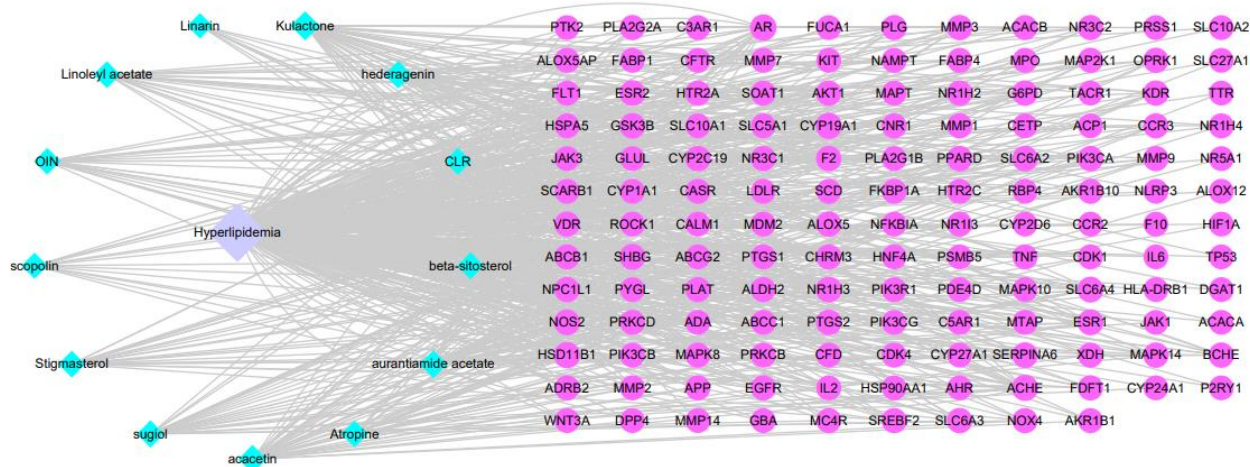


图 3 活性成分-靶点-疾病网络

Fig. 3 Active ingredient-target-disease target network

析, 以度值反映节点的重要程度, 度值越大则表示其在该网络中越重要。地骨皮中筛选的 14 个成分中主要的活性成分为苦楝萜酮内酯、莨菪碱、金色酰胺醇酯、醋酸芳樟酯、 β -谷甾醇、大黄素、金合欢素等。

3.5 GO 功能和 KEGG 通路富集分析

将地骨皮调血脂作用交集靶点导入到 Metascape 数据库中进行 GO 功能富集分析 ($P < 0.5$), 主要包括生物过程、细胞组分和分子功能分析。如图 4 所示, 这些成分发挥作用的生物过程主要涉及细胞脂质反应、脂质代谢过程的正调控、脂质定位、脂质定位的调节以及蛋白质磷酸化的正调控等过程; 分子功能主要是包括脂质结合、丝氨酸型肽酶活性、酰胺结合、激酶结合、氧化还原酶活性、脂肪酸的结合和酪氨酸激酶活性; 在细胞成分层面主要作用在细胞膜、细胞膜顶端以及细胞质核周围。进一步进行 KEGG 通路富集分析, 并根据 P 值的大小和富集基因数目筛选, 如图 5 所示, 主要

涉及脂质和动脉粥样硬化、脂肪消化吸收、胆汁分泌等过程, 以及 AMP 激活的蛋白激酶 (AMP-activated protein kinase, AMPK)、PPAR 等信号通路。其中气泡的颜色代表富集显著性, 颜色越红, 代表富集度越高; 而气泡的大小代表该通路上基因富集的数量, 气泡越大代表富集的基因数目越多。

3.6 活性成分-靶点-通路网络图的构建

根据 KEGG 通路富集分析从而构建地骨皮化学成分-靶点-通路网络 (图 6), 节点的大小既反映度值大小, 也反映各成分与靶点以及靶点与通路之间的关系, 节点越大表示其关联程度越高。地骨皮中筛选出的活性成分通过作用在脂质和动脉粥样硬化、胰岛素抵抗、脂肪消化吸收、胆汁分泌、AMPK、PPAR 等信号通路上的清道夫受体 B1 (scavenger receptor B1, SCARB1)、PPAR α 、PPAR γ 、糖原合酶激酶-3 β (glycogen synthase kinase-3 β , GSK-3 β) 等蛋白靶点相互协同作用, 从而发挥调血脂作用。

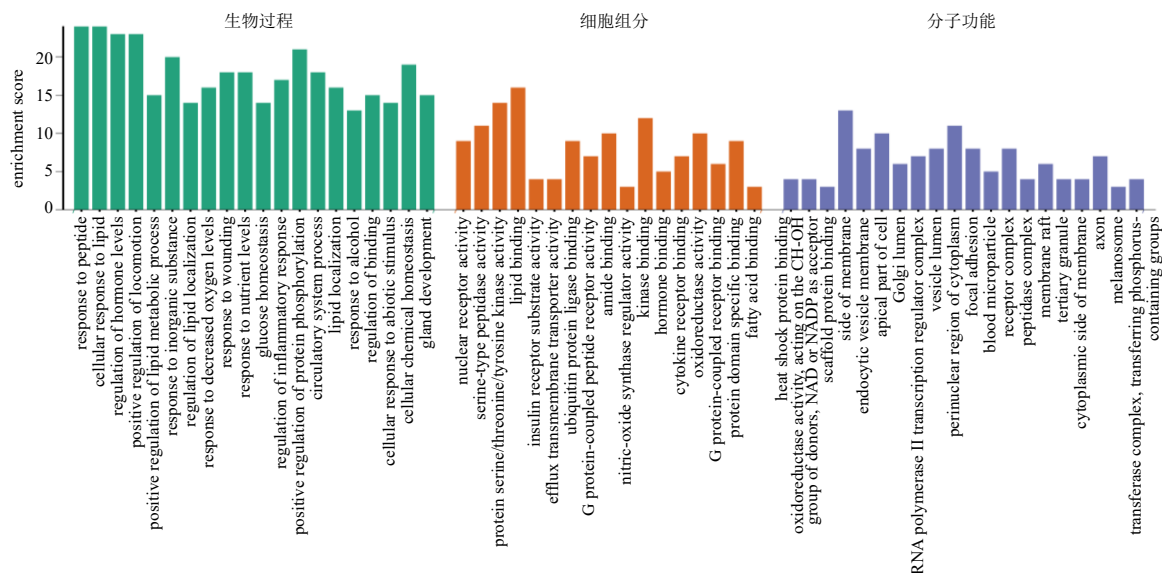


图 4 GO 功能富集分析

Fig. 4 GO function enrichment analysis

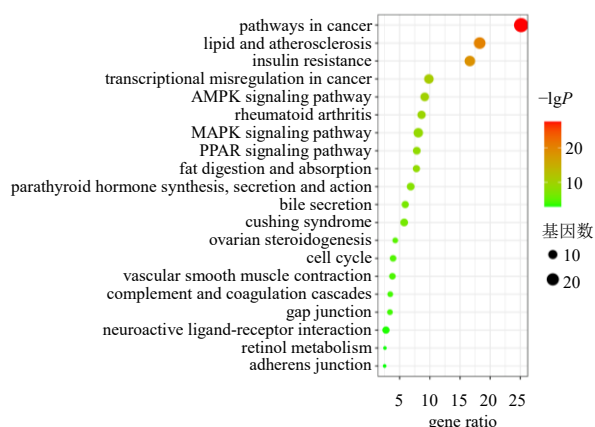


图 5 KEGG 通路富集分析

Fig. 5 KEGG pathway enrichment analysis

3.7 分子对接

将地骨皮中筛选出的 14 个单体化合物与 PPAR 信号通路上的靶点蛋白 PPAR α 和 PPAR γ 进行分子对接，总得分 ≥ 5 表明受体和配体亲和力较大，对接越好。各配体分子和受体蛋白的分子对接得分结果见表 2，可以看出茛菪碱、金合欢素、蒙花苷、阿托品、枸杞酰胺、 β -谷甾醇以及大黄素得分均大于 5，说明这些化合物与 PPAR 信号通路上的 PPAR α 以及 PPAR γ 靶蛋白均表现出良好的结合作用。分子对接筛选出的关键活性成分茛菪碱、金合欢素、蒙花苷、阿托品、枸杞酰胺、 β -谷甾醇以及大黄素与靶蛋白 PPAR α 和 PPAR γ 分子对接模型见图 7、8。

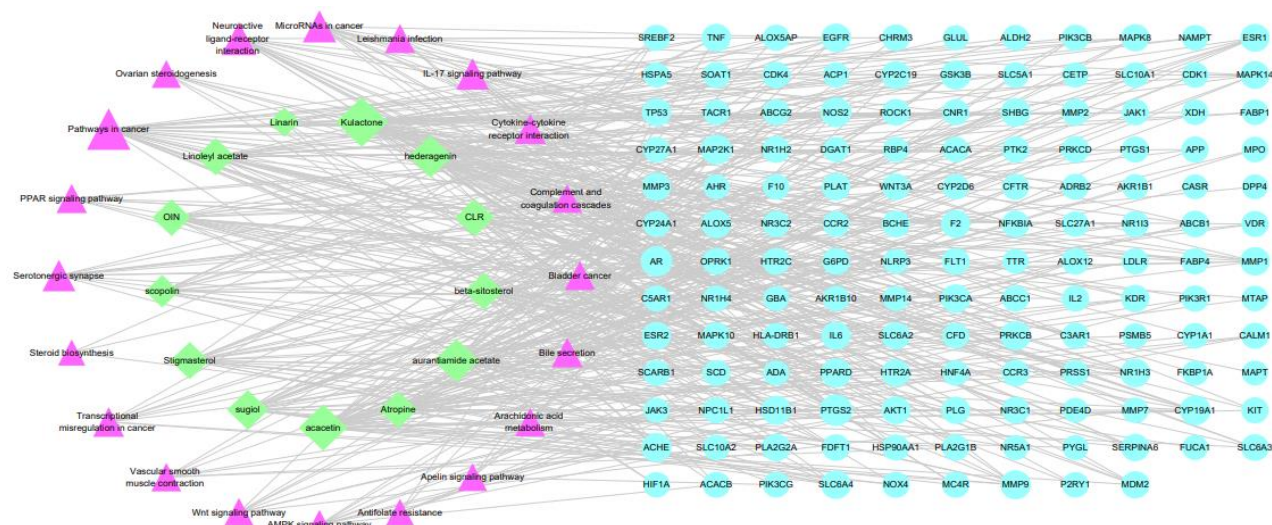


图 6 地骨皮活性成分-靶点-通路网络

Fig. 6 Active ingredient-target-pathway network in Lycii Cortex

表 2 地骨皮活性成分与靶蛋白分子对接结果

Table 2 Docking of core active ingredients of *Lycii Cortex* to key targets

化合物	总得分		化合物	总得分	
	PPAR α	PPAR γ		PPAR α	PPAR γ
莨菪碱	5.059 7	5.068 7	金色酰胺醇酯	5.007 3	5.182 0
醋酸芳樟酯	4.863 2	4.259 0	苦楝萜酮内酯	3.260 3	2.140 0
金合欢素	7.192 4	5.226 6	常春藤皂苷元	2.115 0	1.172 7
蒙花苷	9.114 6	5.617 8	β -谷甾醇	5.400 1	5.311 0
东莨菪苷	3.505 3	4.501 0	豆甾醇	2.712 5	4.869 6
阿托品	5.059 7	5.068 7	胆甾醇	4.321 8	3.685 1
柳杉酚	4.824 8	4.682 0	大黄素	5.822 8	5.789 7

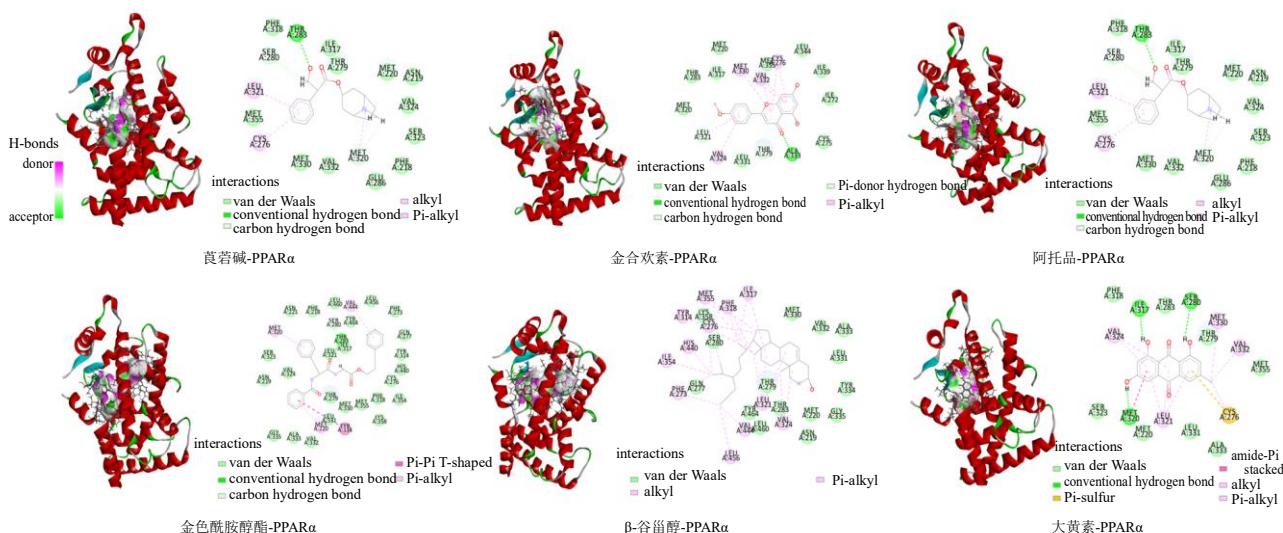


图 7 关键活性成分与靶点蛋白 PPAR α 对接模型图

Fig. 7 Docking model of key components and target PPAR α

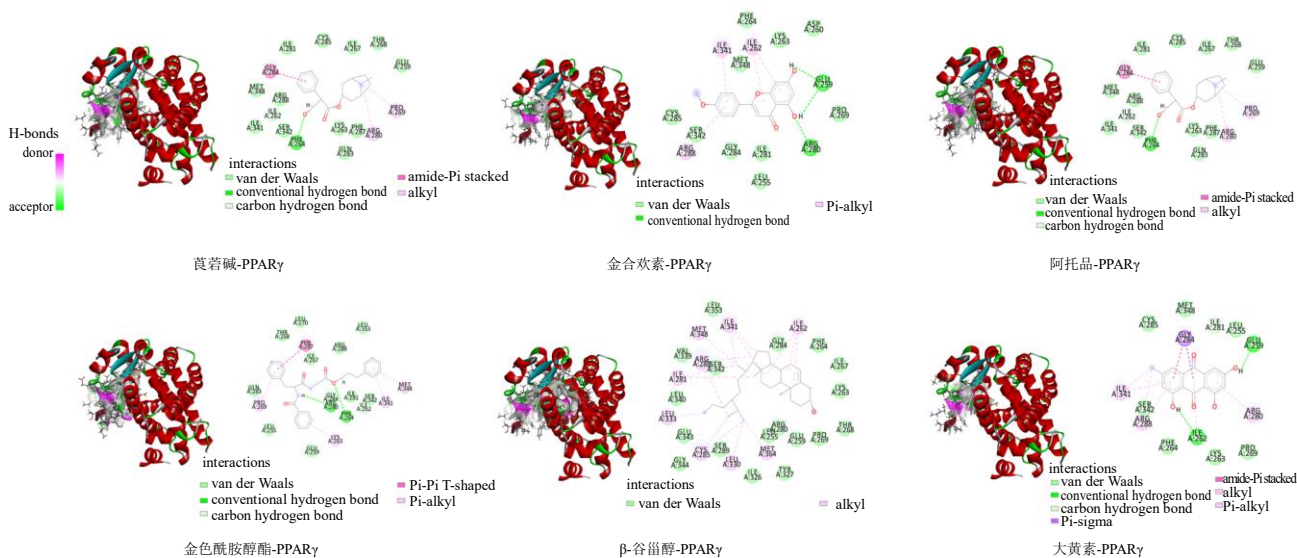


图 8 关键活性成分与靶点蛋白 PPAR γ 对接模型图

Fig. 8 Docking model of key components and target PPAR γ

3.8 β -谷甾醇、蒙花苷、大黄素和金合欢素对 HepG2 细胞活力的影响

经过对比上述分子对接的结果,发现 β -谷甾醇、蒙花苷、大黄素以及金合欢素的得分结果要明显高

于其他成分的得分,说明这 4 个化合物与靶蛋白结合作用更好,可能是潜在的关键活性成分,因此选择 β -谷甾醇、蒙花苷、大黄素以及金合欢素进行 HepG2 细胞调血脂活性筛选。采用 CCK-8 法考察

不同浓度的 β -谷甾醇、蒙花苷、大黄素和金合欢素对 HepG2 细胞活力的影响,如图 9-A 所示,与对照组比较,油酸组和辛伐他汀组对细胞无毒性,因此选取 500 $\mu\text{mol/L}$ 油酸作为造模浓度,20 $\mu\text{mol/L}$ 辛伐他汀作为阳性药浓度; β -谷甾醇、蒙花苷和金合欢素在 0~100 $\mu\text{mol/L}$ 对细胞无明显毒性作用,浓度为 200 $\mu\text{mol/L}$ 时,细胞活力下降,因此选择 100 $\mu\text{mol/L}$ 作为给药浓度;大黄素在 0~50 $\mu\text{mol/L}$ 对细胞无明显毒性作用,浓度为 100 $\mu\text{mol/L}$ 时,细胞活

力下降,因此选择 50 $\mu\text{mol/L}$ 作为大黄素给药浓度。

3.9 β -谷甾醇、蒙花苷、大黄素和金合欢素对油酸诱导的 HepG2 细胞中脂滴含量的影响

如图 9-B 所示,对照组 HepG2 细胞中未出现明显脂滴,500 $\mu\text{mol/L}$ 油酸诱导的模型组细胞中出现大量脂滴 ($P<0.01$),说明造模成功。与模型组比较,辛伐他汀组、 β -谷甾醇组、蒙花苷组、大黄素组脂滴均明显减少 ($P<0.05$ 、 0.01),而金合欢素组效果并不显著。

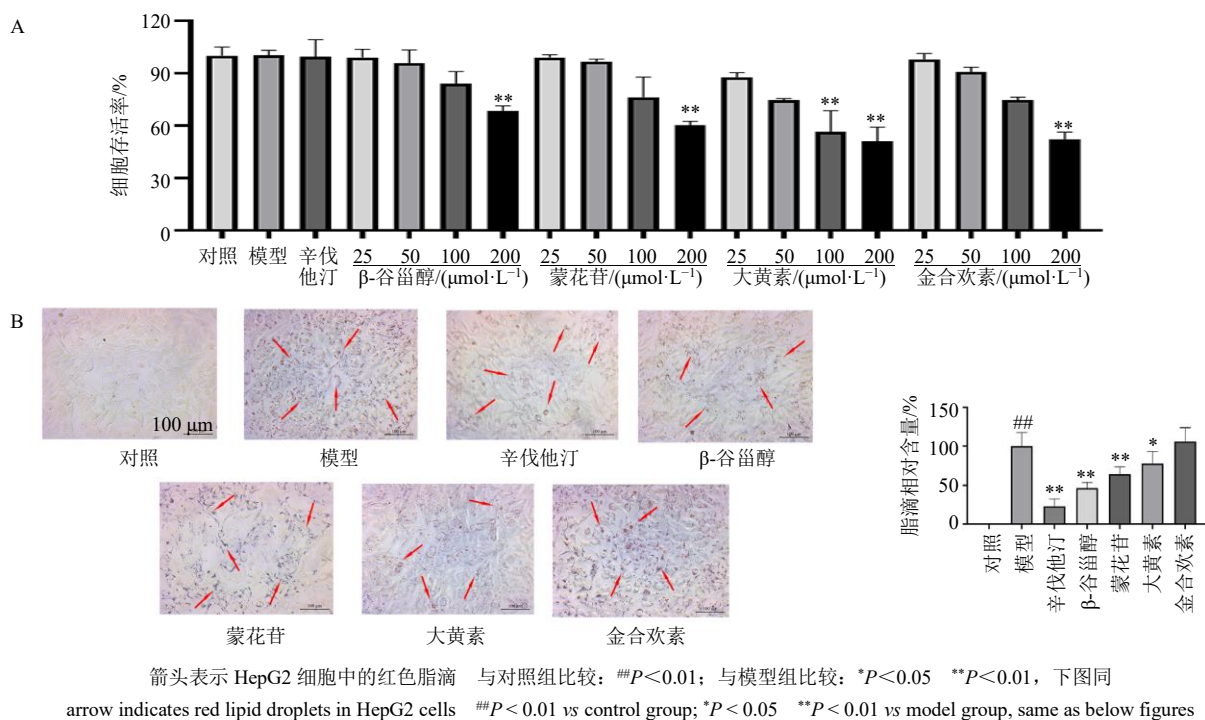


图 9 β -谷甾醇、蒙花苷、大黄素和金合欢素对 HepG2 细胞活力 (A) 以及对油酸诱导的 HepG2 细胞脂质积累 (B) 的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 9 Effects of β -sitosterol, linarin, emodin and acacetin on viability of HepG2 cells (A) and lipid accumulation (B) in HepG2 cells induced by oleic acid ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

3.10 蒙花苷与大黄素对 Caco-2 细胞活力和 ABCA1 蛋白表达的影响

根据 HepG2 细胞调血脂活性筛选结果表明,蒙花苷、 β -谷甾醇以及大黄素的作用效果较为显著,而金合欢素并无显示显著效果;同时 β -谷甾醇在多种药材中均存在,其特征代表性较弱,分子对接得分结果也显示蒙花苷和大黄素与靶蛋白 PPAR α 和 PPAR γ 的结合能力远强于 β -谷甾醇,因此主要考察蒙花苷和大黄素对下游蛋白 ABCA1 表达的影响,进而评价其调血脂作用。

采用 CCK-8 法考察蒙花苷及大黄素对 Caco-2 细胞活力的影响,如图 10-A 所示,与对照组比较,

蒙花苷在 0~100 $\mu\text{mol/L}$ 对细胞无毒性作用,浓度为 200 $\mu\text{mol/L}$ 时,细胞活力下降,所以选择 100 $\mu\text{mol/L}$ 作为给药浓度;大黄素在 0~50 $\mu\text{mol/L}$ 对细胞无毒性作用,浓度为 100 $\mu\text{mol/L}$ 时,细胞活力下降,所以选择 50 $\mu\text{mol/L}$ 作为给药浓度。

ABCA1 是一种完整的细胞膜蛋白,能够通过与载脂蛋白受体相互作用,从而影响高密度脂蛋白胆固醇的生物合成^[10],是影响胆固醇外流的关键调节因子^[11]。血脂的升高与胆固醇的逆向转运有着十分紧密的联系,ABCA1 是介导肝脏中胆固醇输出的关键蛋白,PPAR γ /肝 X 受体 α (liver X receptor α , LXR α)/ABCA1 是一条经典的脂质代谢通路,PPAR γ

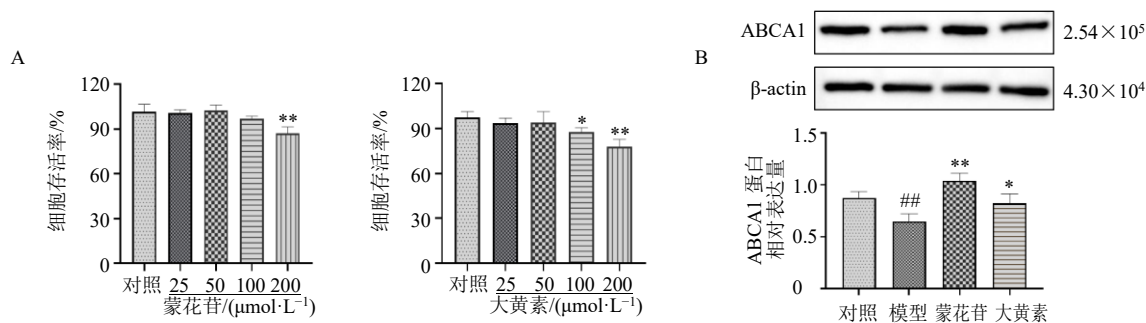


图 10 蒙花苷和大黄素对 Caco-2 细胞活力 (A) 以及 ABCA1 蛋白表达 (B) 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 10 Effects of linarin and emodin on viability of Caco-2 cells (A) and ABCA1 protein expression (B) ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

蛋白表达的升高可以激活下游相关蛋白如 ABCA1 的表达升高, 从而促进胆固醇以及脂质的代谢。如图 10-B 所示, 与对照组比较, 模型组细胞中 ABCA1 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.01$), 表明模型组细胞胆固醇外流显著降低, 增加了细胞内的脂质蓄积。与模型组比较, 给予蒙花苷 (100 $\mu\text{mol/L}$) 与大黄素 (50 $\mu\text{mol/L}$) 处理均有效地升高了 ABCA1 蛋白的表达水平 ($P < 0.05, 0.01$), 表明蒙花苷与大黄素可通过升高 ABCA1 蛋白的表达促进细胞内胆固醇外流, 减少细胞内的脂质蓄积, 发挥调血脂作用。

4 讨论

血脂异常是指成人血浆总胆固醇、三酰甘油、低密度脂蛋白胆固醇升高和高密度脂蛋白胆固醇降低为特征的疾病^[12]。血脂升高可引发外周血管疾病、动脉粥样硬化、冠心病、胰腺炎等^[13]。大量研究表明, 总胆固醇或低密度脂蛋白胆固醇水平升高在动脉粥样硬化的发生和发展过程中发挥着重要的作用, 与人群中冠心病的发病率和病死率呈显著正相关^[14]。中医古籍中无确切高脂血症病名,《灵枢·五癃津液别》最早出现了有关“膏”的记载:“五谷之津液, 和合而为膏者, 内渗于骨空, 补益脑髓, 而下流于阴股”, 为后世医家有关血脂异常的论述提供了思路。根据其临床表现可归属为“痰湿”“痰浊”“眩晕”“瘀血”等证。我国传统医学治疗血脂异常有着悠久历史。《灵枢·逆顺肥瘦》曰:“血浊气涩, 疾泻之, 则经可通也。”古人认为, 浊之在血脉, 须以清化通利之泻法除去血中之浊物, 方可脉通气顺。地骨皮性凉, 归肺、肝、肾经, 具有清热凉血的功效, 可以通过清化通利之法调节血脂。

本研究根据网络药理学和检索相关文献, 共筛选出茛菪碱、醋酸芳樟酯、金合欢素、蒙花苷、东

莨菪苷、阿托品、柳杉酚、金色酰胺醇酯、苦楝萜酮内酯、常春藤皂苷元、 β -谷甾醇、豆甾醇、胆甾醇和大黄素 14 个潜在活性成分, 得到成分对应的 393 个靶点和 1486 个疾病靶点。将活性成分靶点与疾病靶点取交集, 得到 153 个共有靶点。GO 功能分析显示地骨皮的活性成分发挥调血脂作用主要涉及细胞脂质反应、脂质代谢过程的正调控以及蛋白质磷酸化的正调控等过程, 这些成分可能是通过作用在细胞膜、细胞膜顶端以及细胞质核周围, 从而影响脂质结合、氧化还原酶活性、脂肪酸的结合和酪氨酸激酶活性等分子功能。KEGG 通路分析发现主要涉及脂质和动脉粥样硬化、胰岛素抵抗、脂肪消化吸收、胆汁分泌、AMPK、PPAR 等信号通路。胰岛素抵抗容易导致代谢综合征、2 型糖尿病以及肥胖等症状, 可引起血管内皮功能障碍、血脂异常、高血压和血管炎症等^[15]。研究发现, 地骨皮水提物可以显著降低 2 型糖尿病大鼠的空腹血糖, 改善血脂异常和肝脏病理变化, 可能是通过作用于 AMPK 信号通路上调葡萄糖转运子 4 (glucose transporter 4, GLUT4) 和 PPAR α 蛋白表达水平, 下调 GSK-3 β 蛋白表达来改善胰岛素抵抗^[16]。胰岛素抵抗发生的主要原因是炎性细胞因子的升高, 从而干扰胰岛素信号转导中胰岛素抵抗的正常磷酸化, 进一步阻断下游信号激活的一系列级联放大反应, 从而影响胰岛素的生成、转运等生理功能, 引起胰岛素抵抗, 目前研究较多的炎性细胞因子引起胰岛素抵抗的信号转导通路主要是与 AMPK、GSK-3 β 、蛋白酪氨酸磷酸酶-1B (protein tyrosine phosphatase-1B, PTP-1B)、c-Jun 氨基末端激酶 (c-Jun N-terminal kinase, JNK) 以及核因子- κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) 等信号转导通路有关^[17]。大黄素能够降低 KKA γ 小鼠空腹

血糖、总胆固醇、三酰甘油等,还能减少炎症反应,能够上调 KKA γ 小鼠骨骼肌和脂肪组织 PPAR γ 及 GLUT4 的 mRNA 和蛋白表达水平,从而促进骨骼肌和脂肪组织对体内葡萄糖的摄取,改善胰岛素抵抗^[18]。microRNA-192 与脂肪代谢有关,miR-192 表达的激活以及甾醇调节元件结合转录因子 1 (sterol regulatory element binding transcription factor 1, SREBF1)、PPAR γ 表达的下调能够促进猪卵母细胞的脂质代谢^[19]。PPAR 信号通路是发挥调血脂作用的一条重要途径,PPAR 信号通路上的蛋白如 PPAR α 、PPAR γ 等能够影响脂肪吸收、脂肪代谢、脂质合成等一系列的代谢相关重要环节^[20]。同时 PPAR γ 作为核受体,可以通过降低游离脂肪酸水平调节脂质代谢紊乱,还可以通过调节脂肪因子分泌,促进机体对葡萄糖的利用,进一步改善胰岛素抵抗^[21]。AMPK 信号通路被激活后,下游通路与脂质合成相关的基因和蛋白的表达水平下调,同时能导致 ACC 磷酸化水平提高,从而抑制脂质生成,达到调节脂肪代谢的作用^[22]。

PPAR α 具有多效性,能够参与脂肪酸代谢、胆固醇代谢等过程,可以调节高密度脂蛋白胆固醇、载脂蛋白 ApoI 和 ApoII,减少肝合成和释放低密度脂蛋白胆固醇,调节血脂。激活的 PPAR α 可以促进脂蛋白脂肪酶合成,催化脂蛋白中的三酰甘油酯解成为游离脂肪酸,调节脂质代谢^[23]。PPAR γ 有广泛的生物学效应,在脂肪细胞分化调控、机体糖脂代谢平衡的调节、胰岛素敏感性增强等方面均发挥重要的作用^[24]。分子对接结果显示,地骨皮的调血脂潜在有效成分莨菪碱、金合欢素、蒙花苷、阿托品、金色酰胺醇酯、 β -谷甾醇以及大黄素与靶蛋白 PPAR α 和 PPAR γ 的对接总得分均 ≥ 5 ,说明地骨皮核心潜在活性成分与关键靶点分子生物结合亲和力高,具有较好的药效活性。经过对比发现金合欢素、蒙花苷、 β -谷甾醇以及大黄素的得分结果要明显高于莨菪碱、阿托品和金色酰胺醇酯的得分,说明这 4 个化合物的结合能力更强,药效活性可能更好。推测地骨皮中可能主要是金合欢素、蒙花苷、 β -谷甾醇以及大黄素等潜在活性成分通过作用关键靶蛋白 PPAR α 和 PPAR γ 等,调控 PPAR、AMPK、胰岛素抵抗、脂质代谢等信号通路起到调血脂的作用。

根据文献报道,金合欢素和蒙花苷属于黄酮类化合物,这类成分能够改善血管的通透性及脆性,调节血脂和胆固醇^[25]。席梅等^[26]对金合欢素的调

脂和抗动脉粥样硬化作用进行研究,发现金合欢素能使 HepG2 细胞中低密度脂蛋白受体 mRNA 和蛋白的水平显著升高,降低小鼠血清中的总胆固醇和低密度脂蛋白胆固醇的水平,具有调血脂的效果。 β -谷甾醇是植物甾醇类成分,是中药发挥调血脂的活性成分之一,可以通过抑制肠道中胆固醇的吸收、降低血清总胆固醇或低密度脂蛋白胆固醇来改善血脂异常^[27]。张帆^[28]研究发现 β -谷甾醇等 6 种植物甾醇能显著降低 Caco-2 对胆固醇的吸收,发挥调血脂作用。地骨皮中的莨菪碱类成分也具有一定的调血脂作用^[5-6]。韩伟等^[29]对高脂血症模型鹌鹑连续 ig 大黄素 8 周,发现大黄素能显著降低血清总胆固醇、三酰甘油、低密度脂蛋白胆固醇、丙二醛以及脂质过氧化物的含量,具有显著的调血脂作用。莨菪碱和阿托品是莨菪烷类生物碱,这类成分能明显改善微循环和组织的缺血、缺氧状态,改善血液流变、稳定细胞膜、改善心功能和兴奋中枢神经系统^[30],金色酰胺醇酯具有一定的抗炎活性^[31],而关于这几种成分调血脂方面研究还有待进一步深入。同时根据分子对接结果显示金合欢素、蒙花苷、 β -谷甾醇以及大黄素的调血脂作用可能更为显著,因此选择将金合欢素、蒙花苷、 β -谷甾醇以及大黄素作用于 HepG2 细胞,进行体外调血脂活性筛选。结果显示蒙花苷、 β -谷甾醇以及大黄素对细胞脂质蓄积具有一定的抑制作用,可能是发挥调血脂作用的关键活性成分,而金合欢素对 HepG2 细胞脂质的蓄积并无显著效果。可能是由于金合欢素与 PPAR α 和 PPAR γ 等靶蛋白结合后影响了其他调血脂有关的通路发挥作用,并未对细胞中脂质蓄积产生影响^[26]。

肝脏中 ABCA1 的过表达可以促进胆固醇的外排,导致肝细胞中的脂质积累减少以及高密度脂蛋白胆固醇水平的升高,从而发挥一定的调血脂作用^[32]。Western blotting 实验结果显示,蒙花苷和大黄素给药后显著升高了 ABCA1 蛋白表达水平,从而促进了细胞中胆固醇的外流以及脂质的代谢,发挥调血脂作用。本研究通过网络药理学、分子对接以及细胞实验探究发现地骨皮中的蒙花苷、大黄素以及 β -谷甾醇等活性成分可能是通过作用于 PPAR α 、PPAR γ 等多个靶点,进而影响 PPAR、AMPK、胰岛素抵抗、脂质代谢等信号通路上与调血脂有关的蛋白表达,改善和影响细胞内胆固醇的外流以及脂质积累,发挥调血脂作用。因此地骨皮可能是通过多成分、多靶点、多通路来实现调血脂作用。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 胡盛寿, 高润霖, 刘力生, 等. 《中国心血管病报告 2018》概要 [J]. 中国循环杂志, 2019, 34(3): 209-220.
- [2] 赵佳琛, 金艳, 闫亚美, 等. 经典名方中枸杞及地骨皮的本草考证 [J]. 中国现代中药, 2020, 22(8): 1269-1286.
- [3] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 128.
- [4] 徐鹤然, 赵乐, 张晓娜, 等. 地骨皮化学成分及其生物学功效研究进展 [J]. 日用化学工业, 2021, 51(5): 450-456.
- [5] 王卫杰, 郭闪闪, 何栋, 等. 地骨皮游离蒽醌对高脂大鼠模型降脂作用的实验研究 [J]. 中医药学报, 2017, 45(3): 17-20.
- [6] 李惠, 王卫杰, 何栋. 地骨皮蒽醌对高脂血症大鼠胆汁酸代谢机理研究 [J]. 饲料博览, 2016(11): 40-43.
- [7] 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.
- [8] von Mering C, Jensen L J, Snel B, *et al.* STRING: Known and predicted protein-protein associations, integrated and transferred across organisms [J]. *Nucleic Acids Res*, 2005, 33(Database issue): D433-D437.
- [9] 鲍宗博, 高莹, 刘建伟. 从 Venn 图看信息论中各信息量之间的关系 [J]. 高等数学研究, 2020, 23(1): 69-72.
- [10] Babashamsi M M, Koukhaloo S Z, Halalkhor S, *et al.* ABCA1 and metabolic syndrome; a review of the ABCA1 role in HDL-VLDL production, insulin-glucose homeostasis, inflammation and obesity [J]. *Diabetes Metab Syndr Clin Res Rev*, 2019, 13(2): 1529-1534.
- [11] Yang J L, Chen Y H, Zou T D, *et al.* Cholesterol homeostasis regulated by ABCA1 is critical for retinal ganglion cell survival [J]. *Sci China Life Sci*, 2023, 66(2): 211-225.
- [12] Kopin L, Lowenstein C. Dyslipidemia [J]. *Ann Intern Med*, 2017, 167(11): ITC81-ITC96.
- [13] 陈家伦. 临床内分泌学 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2011: 152.
- [14] Chen G Y, Li L, Dai F, *et al.* Prevalence of and risk factors for type 2 diabetes mellitus in hyperlipidemia in China [J]. *Med Sci Monit*, 2015, 21: 2476-2484.
- [15] Lebovitz H E. Insulin resistance: Definition and consequences [J]. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, 2001, 109(Suppl 2): S135-S148.
- [16] 姚欢欢, 陈吉, 陈思思, 等. 基于 AMPK/GLUT4/GSK3 β /PPAR α 信号通路研究地骨皮水提物改善 2 型糖尿病大鼠胰岛素抵抗的实验研究 [J]. 中国医药导报, 2020, 17(5): 8-12.
- [17] 周方圆, 杨宇峰, 石岩. 2 型糖尿病胰岛素与胰岛素抵抗信号转导通路研究进展 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2016, 18(11): 71-73.
- [18] 宋冰. 大黄素改善 KKAY 胰岛素抵抗糖尿病小鼠作用机制的研究 [D]. 沈阳: 辽宁中医药大学, 2012.
- [19] Dai J G, Huang X M, Zhang C, *et al.* Berberine regulates lipid metabolism via miR-192 in porcine oocytes matured *in vitro* [J]. *Vet Med Sci*, 2021, 7(3): 950-959.
- [20] Luquet S, Gaudel C, Holst D, *et al.* Roles of PPAR delta in lipid absorption and metabolism: A new target for the treatment of type 2 diabetes [J]. *Biochim Biophys Acta BBA Mol Basis Dis*, 2005, 1740(2): 313-317.
- [21] 孙华磊. 紫檀芪通过 PPAR γ 通路改善胰岛素抵抗及其作用机制研究 [D]. 郑州: 郑州大学, 2019.
- [22] 宋宇宙. 牛蒡子苷元通过 AMPK 信号通路调节脂肪代谢的作用研究 [D]. 广州: 广州中医药大学, 2017.
- [23] 王秋丽, 张瑞英. PPAR α 在心血管疾病中作用机制的研究进展 [J]. 临床与病理杂志, 2022, 42(2): 449-454.
- [24] 杨谷良, 潘敏雄, 向福, 等. PPAR γ 调控脂肪细胞增殖和分化机理研究进展 [J]. 食品科学, 2017, 38(3): 254-260.
- [25] 文开新, 王成章, 严学兵, 等. 黄酮类化合物生物学活性研究进展 [J]. 草业科学, 2010, 27(6): 115-122.
- [26] 席梅, 邢建国, 王丽, 等. 金合欢素的降血脂及抗动脉粥样硬化作用及机制初探 [J]. 药学学报, 2019, 54(5): 846-853.
- [27] Vanstone C A, Raeini-Sarjaz M, Jones P J H. Injected phytosterols/stanols suppress plasma cholesterol levels in hamsters [J]. *J Nutr Biochem*, 2001, 12(10): 565-574.
- [28] 张帆. 植物甾醇的生物活性与构效关系初探 [D]. 南昌: 南昌大学, 2018.
- [29] 韩伟, 李小燕, 周利玲, 等. 大黄素的降脂与抗衰老作用 [J]. 中国医学创新, 2009, 6(29): 14-16.
- [30] 贾立静, 沈洪. 莨菪碱类药物在心肺脑复苏中的应用 [J]. 中国全科医学, 2007, 10(8): 644-645.
- [31] 李金凤, 许又凯. 望谟崖摩枝叶的化学成分及其抗炎活性研究 [J]. 天然产物研究与开发, 2018, 30(8): 1361-1366.
- [32] Chen L, Zhao Z W, Zeng P H, *et al.* Molecular mechanisms for ABCA1-mediated cholesterol efflux [J]. *Cell Cycle*, 2022, 21(11): 1121-1139.

[责任编辑 李亚楠]