

雷公藤红素促进小肠上皮细胞肝 X 受体 α 表达调控胆固醇代谢研究

赵谭军, 付可沁, 施树成, 卜兰兰*

湖南中医药大学医学院, 湖南 长沙 410208

摘要: **目的** 运用网络药理学结合实验验证探讨雷公藤红素调控肠上皮细胞胆固醇代谢的潜在靶点及作用机制。**方法** 应用网络药理学筛选雷公藤红素调控肠上皮细胞胆固醇代谢的关键靶点和通路。运用 Autodock Vina 软件进行分子对接验证。通过构建体外肠上皮细胞高胆固醇模型, 考察雷公藤红素对肠上皮细胞胆固醇代谢及其关键通路和靶点表达的影响。**结果** 共获得 94 个雷公藤红素靶点、15 415 个肠道靶点、14 177 个胆固醇代谢靶点。取交集得 75 个共有靶点。蛋白质-蛋白质相互作用 (protein-protein interaction, PPI) 网络筛选得到 1 个关键子网络。基因本体 (gene ontology, GO) 功能富集分析发现网络中的靶点与多种生物功能相关。基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 通路富集分析发现, 雷公藤红素调控肠道胆固醇代谢涉及多条途径, 其中肠道脂质代谢的关键通路 (fat digestion and absorption) 与 PPI 网络中的关键子网络之一密切相关。分子对接结果表明, 雷公藤红素与关键网络中的核心蛋白肝 X 受体 α (liver X receptor α , LXRA) 具有良好的结合亲和力。体外实验表明, 雷公藤红素显著降低高胆固醇环境下肠上皮细胞脂质堆积 ($P < 0.05$ 、0.01、0.001), 显著上调三磷酸腺苷结合盒转运蛋白 G5 和 G8 (adenosine triphosphate-binding cassette transporters G5 and G8, ABCG5/8) 蛋白表达 ($P < 0.05$ 、0.01), 并下调 NPC1 样细胞内胆固醇转运蛋白 1 (NPC1 like intracellular cholesterol transporter 1, NPC1L1) 表达 ($P < 0.05$)。**结论** 雷公藤红素调控肠上皮细胞胆固醇代谢的作用机制可能与调节 LXRA 促进胆固醇流出、抑制胆固醇摄取密切相关。

关键词: 雷公藤红素; 肠上皮细胞; 胆固醇代谢; 网络药理学; 肝 X 受体 α

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2024)11-3716-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.11.014

Celastrol promotes expression of LXRA in small intestinal epithelial cell to regulate cholesterol metabolism

ZHAO Tanjun, FU Keqin, SHI Shucheng, BU Lanlan

School of Medical, Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410208, China

Abstract: Objective To explore the potential targets and mechanism of celastrol on regulating cholesterol metabolism in intestinal epithelial cells using network pharmacology combined with experimental validation. **Methods** Network pharmacology was employed to screen key targets and pathways of celastrol in regulating cholesterol metabolism in intestinal epithelial cells. Molecular docking was performed using Autodock Vina software for validation. An *in vitro* model of high cholesterol in intestinal epithelial cells was constructed to investigate the impact of celastrol on cholesterol metabolism, key pathways and target expression. **Results** A total of 94 targets for celastrol, 15 415 intestinal targets, and 14 177 cholesterol metabolism targets were obtained. The intersection resulted in 75 common targets. A key subnetwork was obtained through protein-protein interaction (PPI) network screening. Gene ontology (GO) function enrichment analysis revealed the involvement of the network targets in various biological functions. Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) pathway enrichment analysis results showed that celastrol regulated intestinal cholesterol metabolism through multiple pathways, with the key pathway of intestinal lipid metabolism (fat digestion and absorption) closely related to the key subnetwork in PPI network. Molecular docking results indicated a strong binding affinity between celastrol and the core protein liver X receptor α (LXRA) in the key network. *In vitro* experiments demonstrated that celastrol significantly reduced cholesterol

收稿日期: 2024-01-03

基金项目: 湖南省自然科学基金资助项目 (2024JJ5302); 湖南中医药大学自然科学基金资助项目 (Z2023XJYB12); 湖南中医药大学大学生创新创业训练项目 (X202310541014); 湖南中医药大学本科生科研创新基金资助项目 (2023BKS178)

作者简介: 赵谭军, 男, 硕士, 研究方向为心血管药理学。E-mail: zhao20221108@gmail.com

*通信作者: 卜兰兰, 女, 博士, 讲师, 研究方向为心血管系统疾病机制及药效学研究。E-mail: lanlan_bu@hnu.edu.cn

accumulation in intestinal epithelial cells under high cholesterol conditions ($P < 0.05$, 0.01, 0.001), upregulated the protein expressions of adenosine triphosphate-binding cassette transporters G5 and G8 (ABCG5/8) ($P < 0.05$, 0.01), and downregulated NPC1 like intracellular cholesterol transporter 1 (NPC1L1) protein expression ($P < 0.05$). **Conclusion** The mechanism of celastrol in regulating cholesterol metabolism in intestinal epithelial cells may be closely related to the modulation of LXR α to promote cholesterol efflux and inhibit cholesterol uptake.

Key words: celastrol; intestinal epithelial cells; cholesterol metabolism; network pharmacology; liver X receptor α

胆固醇稳态对机体正常的细胞和系统功能至关重要,胆固醇平衡失调是心血管疾病、神经退行性疾病和癌症等其他疾病的基础^[1]。胆固醇代谢包括内源性胆固醇合成、吸收和排泄等环节。研究表明,胆固醇在体内不能被降解,有效排泄是维持其稳态的重要环节^[2]。体内积累的胆固醇最终通过肠道以粪便消除胆固醇和胆汁酸的形式达到平衡,目前已知的胆固醇排泄途径包括了胆固醇逆转运(reverse cholesterol transport, RCT)途径和经肠胆固醇排泄(transintestinal cholesterol excretion, TICE)途径;前者是肝脏将胆固醇转化为胆汁酸后经肠排出,后者是由血直接经肠道分泌和排出血浆脂蛋白来源的胆固醇,二者交汇于肠道,因此,肠道在胆固醇稳态中发挥了重要作用^[3-4]。调血脂治疗是防治体内高胆固醇含量诱导的相关疾病的有效方法,目前临床常用调血脂药物他汀类的作用是通过降低低密度脂蛋白胆固醇(low density lipoprotein cholesterol, LDL-C)以限制内源性胆固醇合成,从而防治心血管等疾病的发生发展,但其相关发病率和死亡率仅降低了 30%^[5]。这意味着需要更多策略来解决这个严重的公共卫生事件。

雷公藤红素(celastrol, CeT)是一种从传统中药雷公藤 *Tripterygium wilfordii* Hook. f. 中提取分离出的活性成分,具有抗炎、抗癌和抗动脉粥样硬化等多种药理活性^[6],且具有良好的成药性,被《Cell》杂志列为最可能转化为现代药物的 5 种有潜力传统药物之一^[7]。Zhang 等^[8]前期研究发现,体外有效成分为 CeT 的南蛇藤能够通过促进 RCT 减少脂质蓄积方面具有积极作用,其机制主要是通过激活清除剂受体 B 类成员 1 (scavenger receptor class B member 1, SRB1)、ABC 转运体和细胞色素 P450 家族 7 亚家族 A 成员 1 (cytochrome P450 family 7 subfamily A member 1, CYP7A1) 途径促进胆固醇代谢。然而,有关 CeT 调控胆固醇代谢的作用机制探索尚不完善。此外,迄今为止,并无有关 CeT 通过调控肠道 TICE 途径介导胆固醇代谢的相关研究。

因此,本研究采用网络药理学和系统生物学理论,通过构建“CeT-靶点-肠道胆固醇代谢”多层次网络,初步预测 CeT 调控肠上皮细胞胆固醇代谢的作用机制^[9-10],并结合实验深入探讨和验证 CeT 调控肠上皮细胞胆固醇代谢的作用及机制,旨在为维持体内胆固醇稳态提供新的方向和理论依据。

1 材料

1.1 细胞

大鼠小肠隐窝上皮 IEC-6 细胞(批号 ZQ0783)由中国科学院上海细胞库提供。

1.2 药品与试剂

CeT(批号 C0869)购自美国 Sigma 公司;肝 X 受体 α (liver X receptor α , LXR α)抑制剂 GSK2033(批号 HY-108688)、Bodipy 荧光染色(批号 HY-W090090)购自美国 MCE 公司;0.25%胰蛋白酶(批号 PB180229)购自美国 Hyclone 公司;DMEM 高糖完全培养基(批号 ZQ-121)、DMEM 基础培养基(批号 09122)购自上海中乔新舟生物科技有限公司;磷酸酶抑制剂(批号 CW2383S)、蛋白酶抑制剂(批号 CW2200S)、BCA 试剂盒(批号 CW0014S)、SDS-PAGE 试剂盒(批号 CW0022S)、Loading buffer(批号 CW0028S)液购自康为世纪生物科技股份有限公司;CCK-8 试剂盒(批号 C0037)、RIPA 裂解液(批号 P0013B)、ECL 化学发光试剂盒(批号 P0018S)购自碧云天生物技术股份有限公司;油红 O 染色试剂盒(批号 G1262-4)购自北京索莱宝科技有限公司;PVDF 膜(批号 ISEQ00010)购自美国 Millipore 公司;兔抗三磷酸腺苷结合盒转运蛋白 G5 (adenosine triphosphate-binding cassette transporters G5, ABCG5)抗体(批号 27722-1-AP)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)抗体(批号 10494-1-AP)、山羊抗兔二抗(批号 SA00001-2)购自美国 Proteintech 公司;兔抗 ATP 结合盒转运蛋白 G8 (ATP-binding cassette transporters G8, ABCG8)抗体(批号 A01482-2)购自武汉博士德生物工程有限

公司;兔抗 NPC1 样细胞内胆固醇转运蛋白 1(NPC1 like intracellular cholesterol transporter 1, NPC1L1) 抗体(批号 PA5-116672)购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司;兔抗 LXR α 抗体(批号 ab41902)、DAPI 染液(批号 ab228549)购自英国 Abcam 公司。

1.3 仪器

ix 73 型倒置荧光显微镜(日本 Olympus 公司);FC 型酶标仪、Forma 3 系列 CO₂ 培养箱、EVOS fl auto 全自动荧光倒置荧光光学显微镜(美国 Thermo Fisher Scientific 公司);ChemiDoc XRS+化学发光成像系统、Mini-PROTEAN Tetra 蛋白电泳系统(美国 Bio-Rad 公司)。

2 方法

2.1 网络药理学研究

将 PubChem(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)得到的 CeT 3D 结构导入 PharmMapper(<http://www.lilab-ecust.cn/pharmmapper/>)进行药物靶点预测。通过 NCBI(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)得到肠道和胆固醇代谢靶点。并与 CeT 靶点取交集得到共有靶点;通过 STRING(<https://STRING-db.org>)进行蛋白质-蛋白质相互作用(protein-protein interaction, PPI)网络构建,并导入 Cytoscape 3.9.1 软件构建网络模型并分析;通过 DAVID(<https://david.ncifcrf.gov/>)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 PDB(<https://www.rcsb.org/>)筛选并下载分辨率小于 0.25 nm 的靶点的结晶复合式,结合上述得到的 CeT 3D 结构,采用 Autodock 进行分子对接,运用 PyMol 可视化处理。

2.2 实验验证

2.2.1 IEC-6 细胞培养 IEC-6 细胞用 DMEM 高糖完全培养基于 37 °C、5% CO₂ 的恒温培养箱中常规培养。

2.2.2 CCK-8 法检测细胞存活率 将对数生长期的 IEC-6 细胞接种于 96 孔板中,5×10³ 个/孔。每孔加入 100 μ L 含不同浓度(0.05、0.10、0.20、0.40、0.80 μ mol/L) CeT 的培养基,另设置加入无药物培养基的对照组,每组设置 5 个复孔,培养箱中培养 24、48 h。每孔加入 10 μ L CCK-8 试剂,于培养箱中孵育 1~2 h 后,采用酶标仪在 450 nm 处检测吸光度(A)值,计算细胞存活率。

$$\text{细胞存活率} = A_{\text{给药}} / A_{\text{对照}}$$

2.2.3 油红 O 染色评估 CeT 对肠上皮细胞胆固醇的影响 设置对照组、模型组和 CeT (0.05、0.10、0.20 μ mol/L)组,除对照组外,其余各组加入 DMEM 基本培养基配制的胆固醇胶束(cholesterol micelles, C-M, 10 mmol/L)构建肠上皮细胞高胆固醇模型^[11],给药组加入不同浓度的 CeT 溶液,对照组加入不含药物的培养基。干预 24 h 后,加入 ORO Fixative 固定液固定细胞;加入 1 mL 60%异丙醇浸洗;加入油红 O 染液(ORO Stain A: ORO Stain B=3:2),洗涤至孔内无红色剩余;加入 Mayer 苏木素染色液,洗涤;加入油红 O 染液缓冲液;加入蒸馏水覆盖细胞并拍照,使用 Image-Pro Plus 软件以脂滴与整个图像的面积比进行定量。

2.2.4 Bodipy 荧光标记法 按“2.2.3”项下方法进行分组和给药,干预 24 h 后, PBS 洗涤,室温下多聚甲醛固定 30 min;每孔加入 2 μ mol/L Bodipy 染色液,于 37 °C 细胞培养箱中孵育 15 min;弃去染色液, PBS 洗涤;DAPI 复染核 5 min, PBS 洗涤;观察并拍照。使用 Image-Pro Plus 软件以荧光强度进行统计。

2.2.5 Western blotting 检测 TICE 相关蛋白表达 按“2.2.3”项下方法进行分组和给药,干预 24 h 后,收集细胞;PBS 洗涤后使用蛋白裂解液提取总蛋白质,BCA 定量法测定蛋白质浓度。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%脱脂牛奶封闭 3 h,用 TBST 洗涤后加入一抗,4 °C 孵育过夜;洗涤后加入二抗,室温孵育 2 h;洗涤后进行显影,使用 Image-Pro Plus 软件分析条带灰度值。

2.2.6 免疫荧光检测 LXR α /ABCG8 和 LXR α /NPC1L1 通路相关蛋白的影响 设置对照组、模型组、CeT (0.1 μ mol/L)组、GSK2033 (10 μ mol/L)组和 CeT+GSK2033 组,除对照组外,其余各组加入 DMEM 基本培养基配制的胆固醇胶束(10 mmol/L)构建肠上皮细胞高胆固醇模型,各给药组加入相应药物,对照组加入不含药物的培养基。干预 24 h 后, PBS 洗涤 3 次;4%多聚甲醛固定 30 min, PBS 洗涤 3 次后加入 Triton X-100,室温下通透 10 min; PBS 洗涤 3 次后,加入免疫染色封闭液封闭 60 min,吸去多余的牛血清白蛋白;分别滴加 100 μ L LXR α (1:200)、ABCG8 (1:200)、NPC1L1 (1:200)一抗,4 °C 孵育过夜;回收一抗, PBS 浸洗 3 次,滴加 100 μ L 二抗 (1:300),室温避光孵

育 60 min; PBS 洗涤 3 次, 滴加 DAPI 复染核 15 min, PBS 洗涤 3 次; 滴加抗淬灭剂 10 μ L, 扣片, 正面朝下盖在载玻片上, 荧光显微镜下观察并拍照。使用 Image-Pro Plus 软件分析荧光强度。

2.2.7 统计学分析 采用 GraphPad Prism 9.0 和 SPSS 26.0 软件进行统计分析, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。两组间数据分布的正态性和方差齐性分别以 Kolmogorov-Smirnov 和 Levene 检验确定。组间均数比较采用 t 检验; 多组间均数比较采用单因素方差分析, 组间有差异进一步采用 SNK- q 检验进行两两比较。

3 结果

3.1 网络药理学研究

3.1.1 CeT-肠道胆固醇代谢靶点 通过 TCMSP 等数据库得到 94 个 CeT 相关靶点。通过 NCBI Gene 等数据库得到 15 415 个肠道相关靶点、14 177 个胆固醇代谢相关靶点。并构建韦恩图预测 CeT-肠道胆固醇代谢共有靶点, 见图 1。

3.1.2 CeT-靶点-肠道胆固醇代谢网络构建 将 PPI 导入 Cytoscape 3.8.1 软件进行可视化, 发现 1 个关键的子网络, 见图 2。

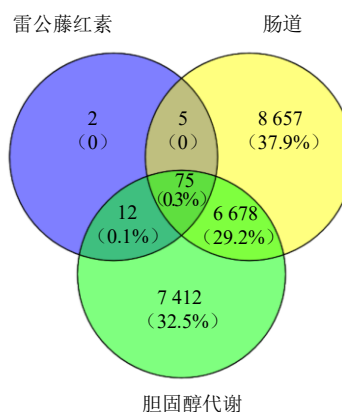


图 1 CeT-肠道胆固醇代谢共有靶点韦恩图
Fig. 1 Venn diagram illustrating common targets of cholesterol metabolism in intestinal tract in CeT

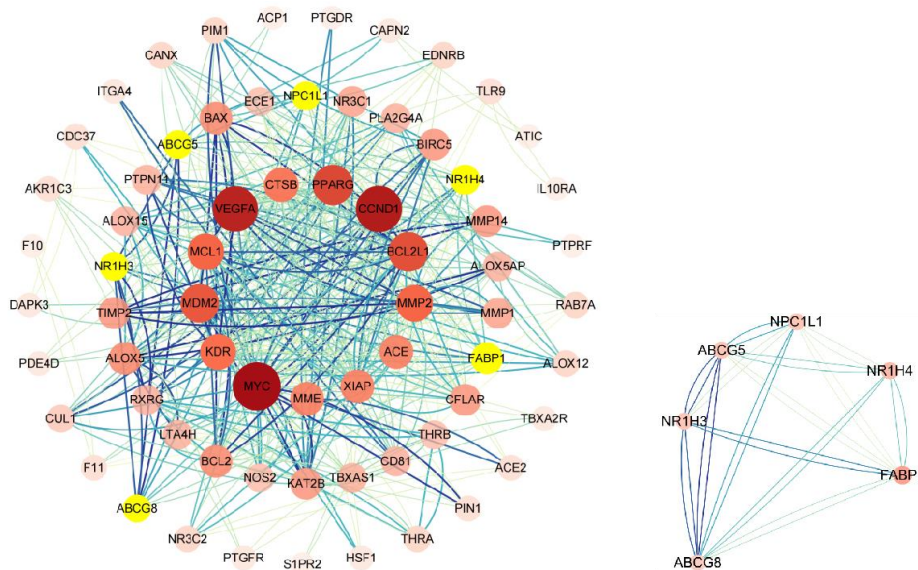


图 2 CeT-肠道胆固醇代谢共有靶点相互作用网络
Fig. 2 CeT-intestinal cholesterol metabolism shared target interaction network

3.1.3 CeT-肠道胆固醇代谢的 GO 功能富集分析 对 CeT 调控肠道胆固醇代谢的作用及机制进行 GO 富集分析, 分别得到 855 个生物进程、17 个细胞组成、53 个分子功能, 根据 $P < 0.05$, 选出排名前 10 的条目, 见图 3。

3.1.4 CeT-肠道胆固醇代谢的 KEGG 通路富集分析 CeT 调控肠道胆固醇代谢的通路涉及 34 条, 根据 $P < 0.05$, 选出排名前 10 的通路, 见图 4。其中, 主要涉及脂肪的消化和吸收、过氧化物酶体增殖物激活受体 (peroxisome proliferators-activated receptor,

PPAR) 等信号通路。其中, 肠道脂质代谢的关键通路 (fat digestion and absorption) 的靶点 (ABCG5、ABCG8、NPC1L1) 主要涉及 CeT-靶点-肠道胆固醇代谢网络的关键网络之一 (图 5)。并且该网络主要涉及胆固醇排泄的关键途径——TICE 途径。

3.2 分子对接分析

CeT 与 NR1H3 (LXR α) 结合能为 -28.131 4 kJ/mol, 可视化显示, 匹配度良好, 化合物与靶点结合的最优构象以氢键的方式呈现, 结合活性良好, 见图 6。

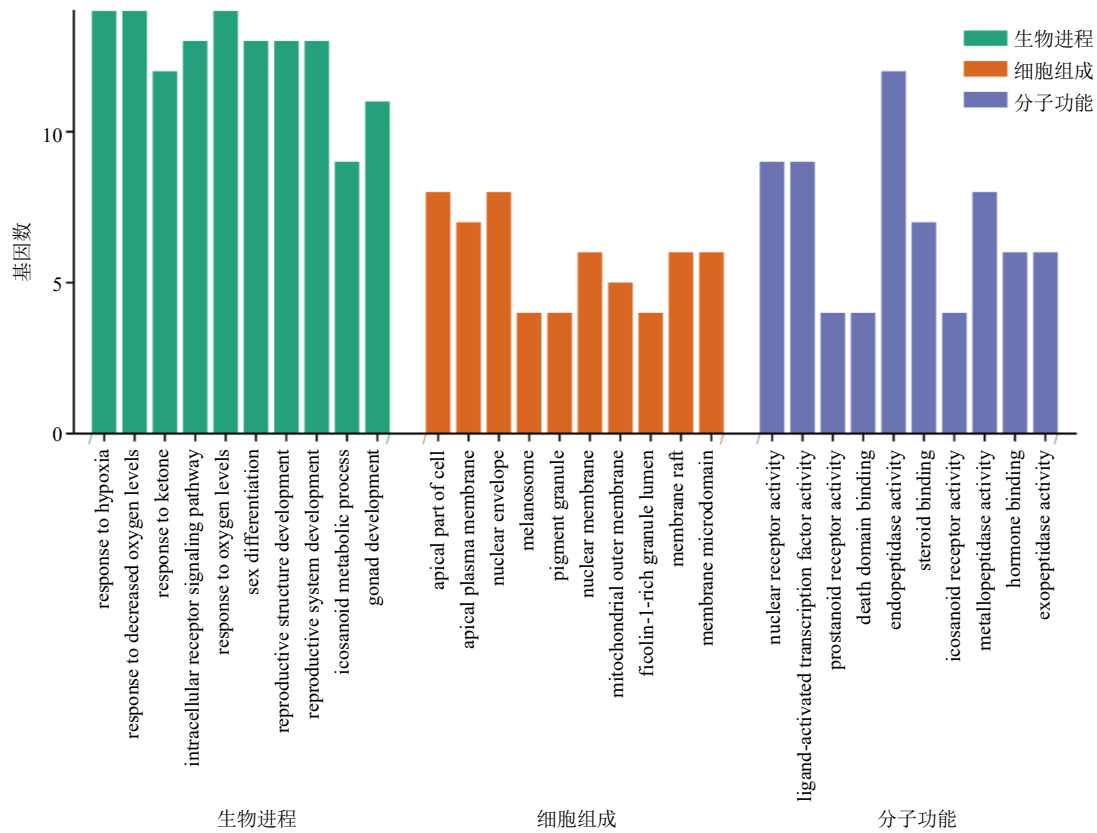


图 3 CeT-肠道胆固醇代谢靶点 GO 功能富集分析

Fig. 3 GO function enrichment analysis of CeT-intestinal cholesterol metabolism

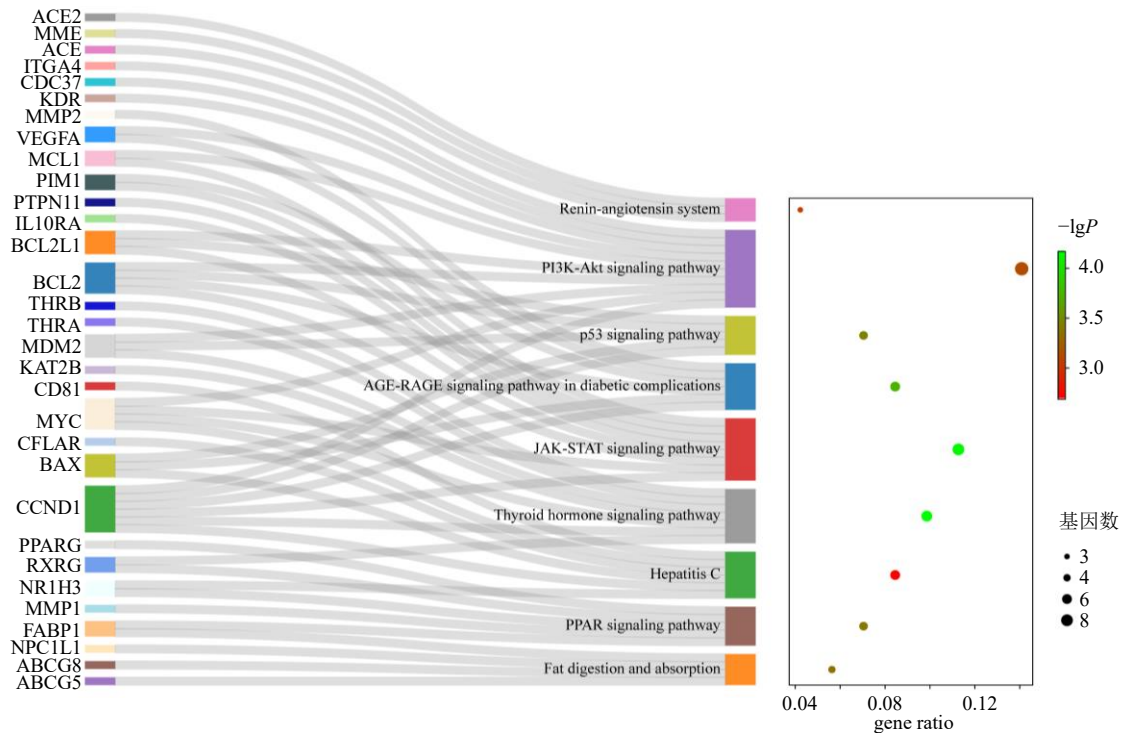


图 4 CeT-肠道胆固醇代谢靶点 KEGG 通路富集分析

Fig. 4 KEGG pathway enrichment analysis of CeT-intestinal cholesterol metabolism

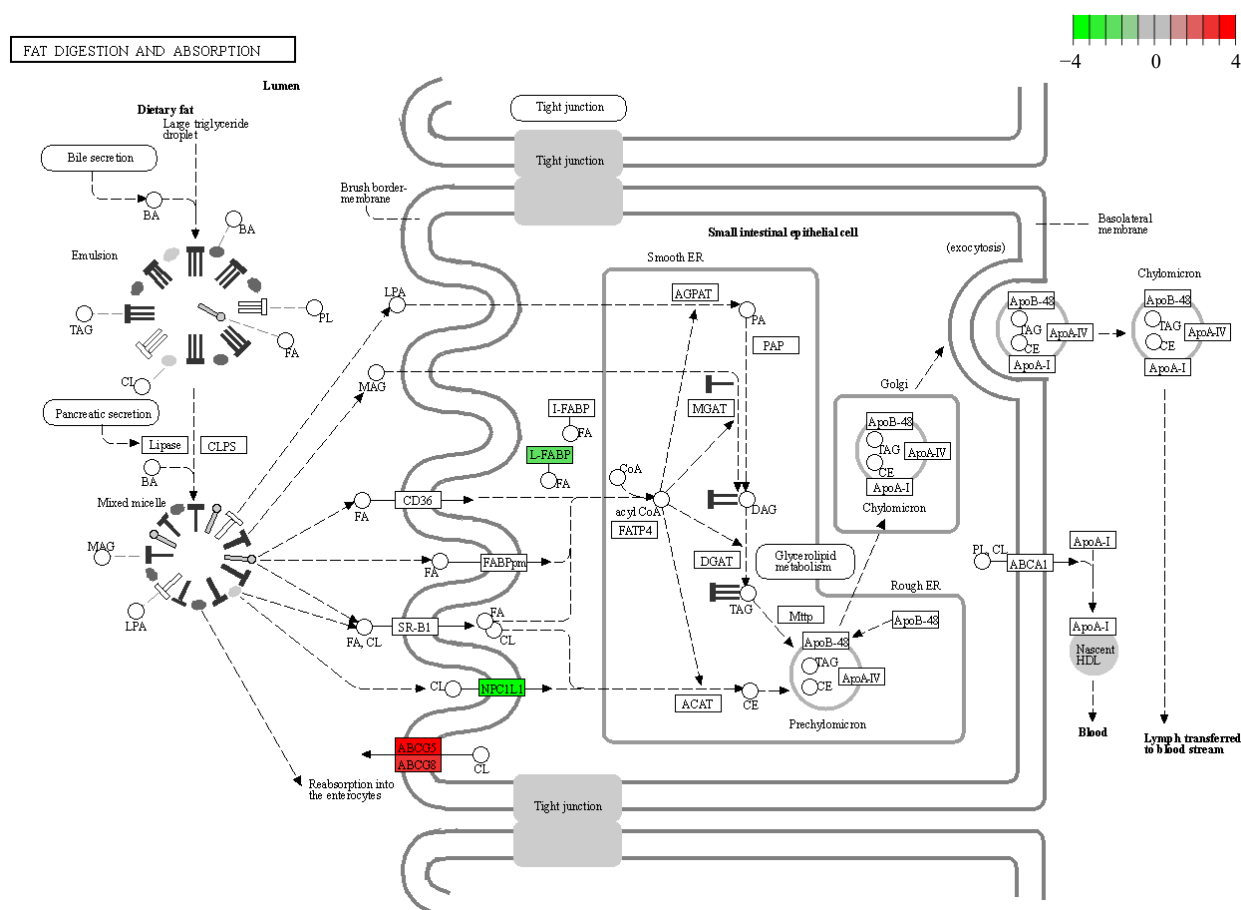


图 5 脂肪的消化和吸收信号通路

Fig. 5 Signaling pathways of fat digestion and absorption

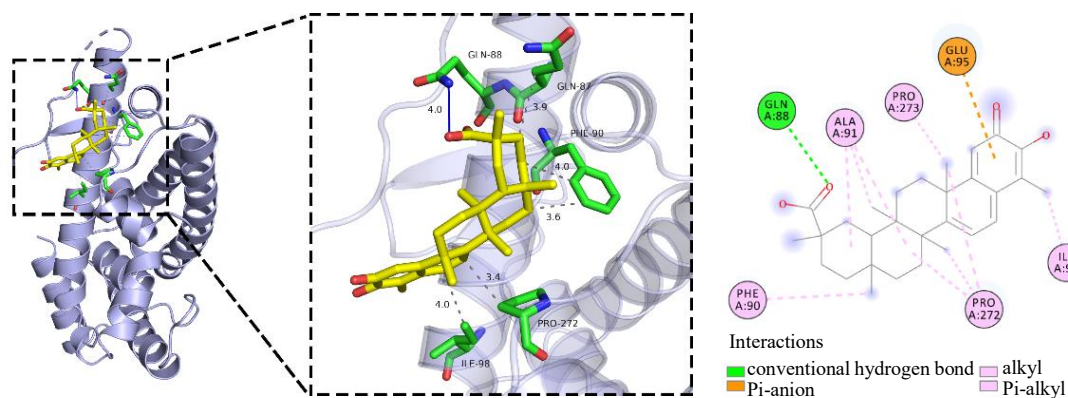


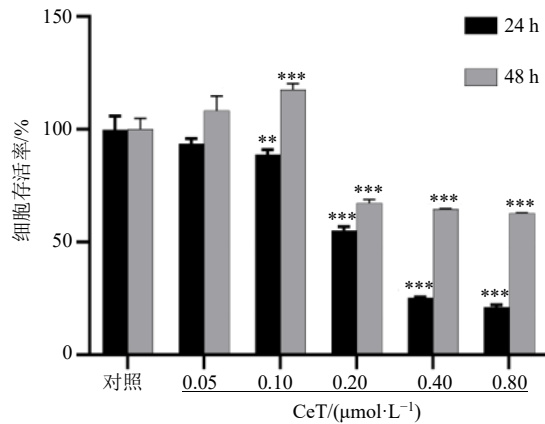
图 6 CeT 与 LXRA 分子对接的可视化图

Fig. 6 Visualization of molecular docking between CeT and LXRA

3.3 体外实验研究

3.3.1 CeT 浓度筛选 不同浓度 (0.05、0.1、0.2、0.4、0.8 $\mu\text{mol/L}$) 的 CeT 分别干预 IEC-6 细胞 24、48 h 后, 如图 7 所示, 干预 24 h 时随着 CeT 浓度的增加细胞存活率降低, CeT 的半数抑制浓度 (half

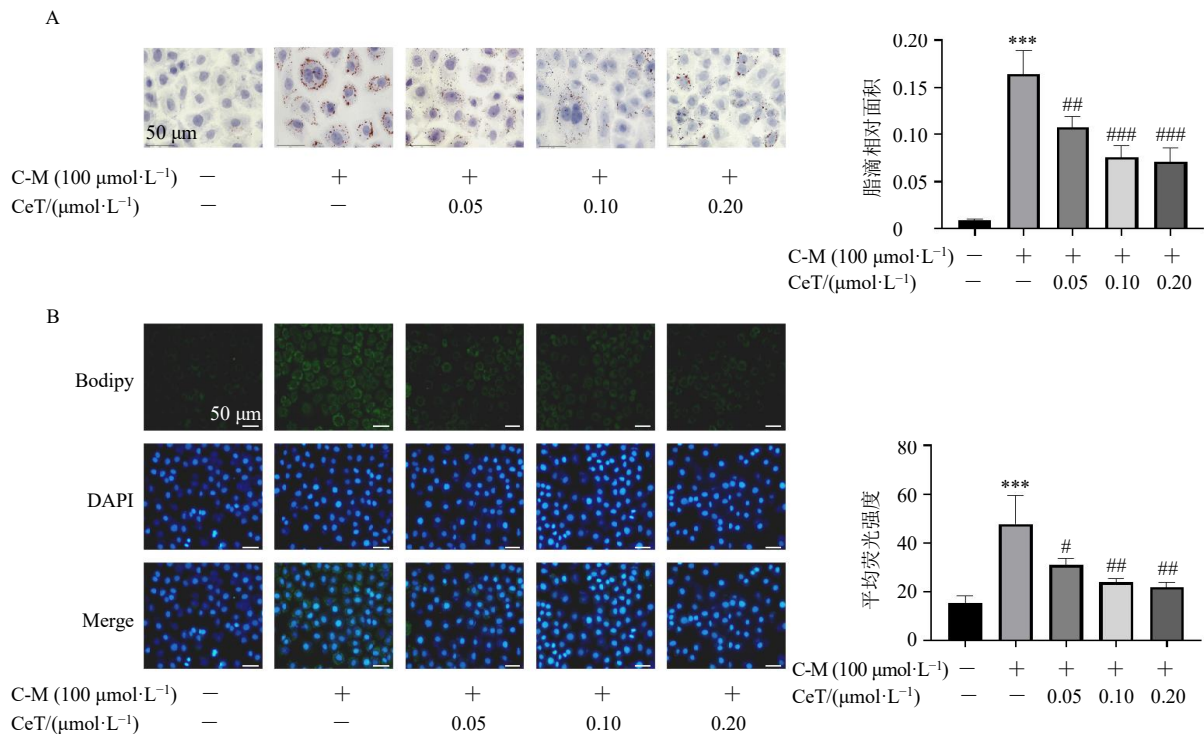
inhibitory concentration, IC_{50}) 为 0.2 $\mu\text{mol/L}$ 。本研究在探索 CeT 安全浓度调控 IEC-6 细胞胆固醇代谢活性的同时, 为了更进一步研究 CeT 在 IC_{50} 时是否较安全浓度的效果更好, 因此, 选择 0.05、0.10、0.20 $\mu\text{mol/L}$ 的 CeT 处理细胞 24 h 进行后续研究。



与相同处理时间的对照组比较: ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ 。
** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs control group at same time.

图 7 不同浓度 CeT 和不同处理时间对 IEC-6 细胞存活率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 7 Effect of different concentrations of CeT and different treatment time on survival rate of IEC-6 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)



A-油红 O 染色测定不同浓度 CeT 对造模后 IEC-6 细胞中脂质蓄积的影响 ($\times 1200$); B-Bodipy 荧光标记法测定不同浓度 CeT 对造模后 IEC-6 细胞中脂质蓄积的影响 ($\times 200$); 与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$; 与模型组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$, 下图同。

A-effect of different concentration of CeT on lipid accumulation in modeled IEC-6 cells detected by Oil red O staining ($\times 1200$); B-effect of different concentration of CeT on lipid accumulation in modeled IEC-6 cells detected by Bodipy fluorescence labeling method ($\times 200$); * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs control group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$ vs model group, same as below figures.

图 8 CeT 对 IEC-6 细胞内脂质的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 8 Effect of CeT on intracellular lipids in IEC-6 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3.3.2 CeT 对 IEC-6 细胞内脂质的影响 如图 8 所示, 油红 O 染色与 Bodipy 荧光标记结果均显示, 与对照组比较, 胆固醇胶束干预显著增加脂滴染色和荧光强度 ($P < 0.001$), 表明造模成功; 与模型组比较, 各剂量 CeT 均显著抑制 IEC-6 细胞中脂质积累 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001)。

3.3.3 CeT 对 TICE 途径关键蛋白的影响 NPC1L1 是胆固醇吸收的重要蛋白, ABCG5/G8 与胆固醇流出密切相关。如图 9 所示, 与对照组比较, 模型组 NPC1L1 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.05$), ABCG5 和 ABCG8 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01); 与模型组比较, CeT ($0.2 \mu\text{mol/L}$) 组 NPC1L1 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05$), CeT (0.1 、 $0.2 \mu\text{mol/L}$) 组 ABCG5 和 ABCG8 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.01)。因此, CeT 可能通过抑制 NPC1L1, 促进 ABCG5、ABCG8 的表达, 调控 TICE 途径介导的胆固醇摄取和流出。

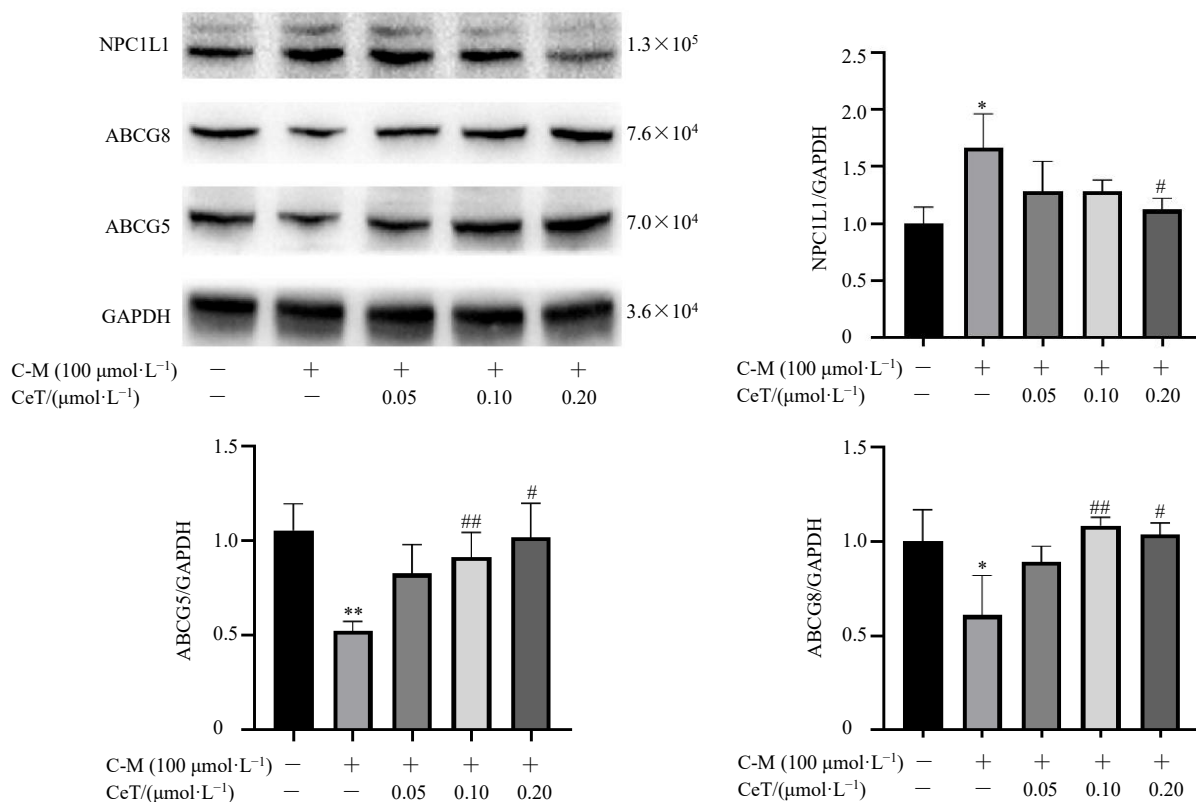


图 9 CeT 对 TICE 途径关键蛋白 NPC1L1、ABCG5 和 ABCG8 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 9 Effect of CeT on expressions of key proteins NPC1L1, ABCG5 and ABCG8 in TICE pathway ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

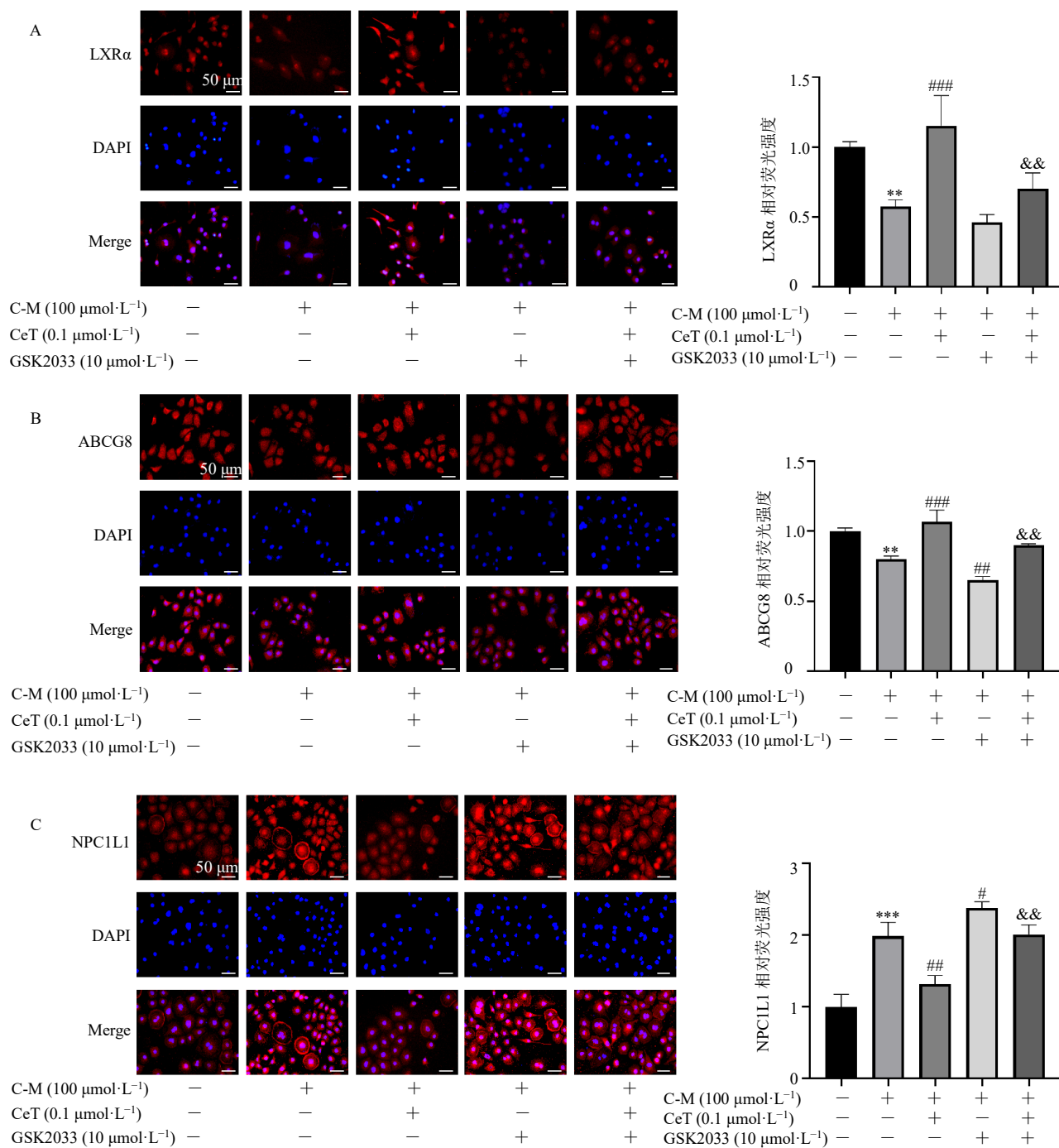
3.3.4 LXR α 是 CeT 调控 TICE 途径的关键蛋白 如图 10 所示,与对照组比较,模型组 LXR α 、ABCG8 表达显著降低 ($P < 0.01$), NPC1L1 表达显著增加 ($P < 0.001$); 与模型组比较, CeT 组 LXR α 、ABCG8 表达显著增加 ($P < 0.001$), NPC1L1 表达显著降低 ($P < 0.01$), LXR α 抑制剂 GSK2033 组 ABCG8 表达显著降低 ($P < 0.01$), NPC1L1 表达显著增加 ($P < 0.05$); 与 CeT 组比较, CeT+GSK2033 组 LXR α 、ABCG8 表达显著降低 ($P < 0.01$), NPC1L1 表达显著增加 ($P < 0.01$)。因此, CeT 可能通过促进 LXR α 的表达, 调控 TICE 途径中的关键蛋白 NPC1L1、ABCG8 介导的胆固醇摄取和流出。

4 讨论

胆固醇广泛存在于机体中, 具有广泛的生理作用, 是组织细胞中不可缺少的重要物质, 它不仅参与细胞膜的形, 也是合成胆汁酸、维生素 D 及甾体激素的重要原料, 但当其过量时便会导致高胆固醇血症, 研究表明, 心血管疾病、胆结石和肿瘤与高胆固醇血症密切相关^[12-13]。胆固醇在体内不能被降解, 机体有效排泄胆固醇是维持胆固醇稳态的重要环节^[2]。因此, 促进体内胆固醇排泄以维持体内

胆固醇的动态平衡可能是治疗胆固醇失衡相关疾病的新策略。

基于此, 本研究通过网络药理学方法, 探讨 CeT 通过调控肠上皮细胞胆固醇代谢的潜在靶点及相关机制。PPI 网络发现, CeT 调控肠上皮细胞胆固醇代谢涉及 1 个核心子网络。其中, ABCG5/8 与 NPC1L1 为胆固醇摄取与流出相关的核心靶点。本研究通过体外构建和模拟肠上皮细胞高胆固醇环境, 探索 CeT 调控肠上皮细胞胆固醇代谢的机制, 油红 O 和 Bodipy 结果均显示, CeT 能够呈浓度相关性地降低胆固醇胶束干预的肠上皮细胞内的脂质积蓄。进一步通过结合 KEGG 通路分析发现, 该子网络中的核心靶点与肠道脂质代谢的关键通路 (fat digestion and absorption) 相匹配, 通过深度分析该通路发现, 其主要涉及肠上皮细胞摄取与流出胆固醇中的 TICE 途径。已有研究表明, 胆固醇从体内排出的唯一途径是通过粪便直接排出或转化为胆汁酸后排出, 粪便排泄可通过 2 种独立途径进行, 第 1 种途径是胆汁分泌, 该途径已被广泛描述和研究。第 2 种途径是通过 TICE 途径^[14]。在 2009 年 Van 团队初步研究估计, TICE 对野生型小鼠体内排出的粪



A-LXRα 蛋白表达 ($\times 200$); B-ABCG8 蛋白表达 ($\times 200$); C-NPC1L1 蛋白表达 ($\times 200$); 与 CeT 组比较: && $P < 0.01$ 。

A-LXRα protein expression ($\times 200$); B-ABCG8 protein expression ($\times 200$); C-NPC1L1 protein expression ($\times 200$); && $P < 0.01$ vs CeT group.

图 10 LXRα 抑制剂 GSK2033 对 TICE 途径相关蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 10 Effect of LXRα inhibitor GSK2033 on expressions of TICE pathway-associated proteins ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

便中性固醇总量的贡献约为 30%^[15]。接下来,该团队在 2010 年通过实验得出在小鼠中 TICE 途径占粪便中性固醇排泄的 70%^[16]。在人体生理情况下,TICE 途径排泄的胆固醇占粪便胆固醇排泄总量的 35%^[2,17]。TICE 指由血直接经肠道分泌和排出血浆脂蛋白来源的胆固醇。包括肝源性含载脂蛋白 B 的

脂蛋白被基底膜侧低密度脂蛋白受体 (low density lipoprotein receptor, LDLR) 和其他可能受体吸收、内化,最终通过 ABCG5/G8 以及其他可能的转运体从顶端膜流出排泄到肠腔^[18]。另有研究发现,利用 Ezetimibe 抑制 NPC1L1 介导的胆固醇摄取可显著增强 TICE 途径^[2]。而本研究表明,CeT 干预处于高

胆固醇环境中的肠上皮细胞后, NPC1L1 被抑制, 而 ABCG5、ABCG8 被激活。提示, CeT 主要通过抑制 NPC1L1 减少肠上皮细胞胆固醇摄取和促进 ABCG5、ABCG8 增加胆固醇流出。

LXR α 由于其抗动脉粥样硬化、去除胆固醇和抗炎活性, 在胆固醇稳态的转录调控中发挥极其关键作用^[19]。研究发现, LXR α 可调控 NPC1L1 在肠上皮细胞中的表达, 降低肠道胆固醇的吸收^[20]。此外, ABCG5 和 ABCG8 是 LXR α 的直接靶基因, 常形成异二聚体 ABCG5/G8 发挥作用, 负责将细胞内胆固醇泵入肠腔并最终通过粪便排出体外^[21]。PPI 子网络表明, NPC1L1、ABCG5 以及 ABCG8 主要由 LXR α 交联。因此, 在上述研究的基础上, 通过分子对接模拟了 CeT 与 LXR α 的对接模式, 结合活性良好。采用 LXR α 抑制剂 GSK2033 处理, 结果显示, NPC1L1 和 ABCG5/G8 主要受 LXR α 调控。提示, CeT 可能通过 LXR α /ABCG5/ABCG8 和 LXR α /NPC1L1 途径分别介导 IEC-6 细胞胆固醇摄取和流出, 进而促进 TICE 途径介导的胆固醇排泄。

本研究通过网络药理学和相关实验发现, CeT 可能通过抑制肠上皮细胞胆固醇摄取和促进胆固醇流出维持机体胆固醇稳态, 这一效应与核心靶点 LXR α 密切相关, 本研究拓展了 CeT 调控体内胆固醇代谢的机制, 为维持体内胆固醇稳态和胆固醇失衡相关疾病的新药研发提供了新思路。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Luo J, Yang H Y, Song B L. Mechanisms and regulation of cholesterol homeostasis [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2020, 21(4): 225-245.
- [2] Jakulj L, van Dijk T H, de Boer J F, *et al.* Transintestinal cholesterol transport is active in mice and humans and controls ezetimibe-induced fecal neutral sterol excretion [J]. *Cell Metab*, 2016, 24(6): 783-794.
- [3] Ouimet M, Barrett T J, Fisher E A. HDL and reverse cholesterol transport [J]. *Circ Res*, 2019, 124(10): 1505-1518.
- [4] Garçon D, Berger J M, Cariou B, *et al.* Transintestinal cholesterol excretion in health and disease [J]. *Curr Atheroscler Rep*, 2022, 24(3): 153-160.
- [5] Go A S, Mozaffarian D, Roger V L, *et al.* Executive summary: Heart disease and stroke statistics: 2014 update: A report from the American Heart Association [J]. *Circulation*, 2014, 129(3): 399-410.
- [6] 徐资怡, 石金凤, 鲜静, 等. 雷公藤红素单用和联用抗肿瘤作用机制的研究进展 [J]. *中草药*, 2021, 52(14): 4372-4385.
- [7] Corson T W, Crews C M. Molecular understanding and modern application of traditional medicines: Triumphs and trials [J]. *Cell*, 2007, 130(5): 769-774.
- [8] Zhang Y, Si Y H, Zhai L, *et al.* *Celastrus orbiculatus* Thunb. reduces lipid accumulation by promoting reverse cholesterol transport in hyperlipidemic mice [J]. *Lipids*, 2016, 51(6): 677-692.
- [9] Liu L H, Du B, Zhang H Y, *et al.* A network pharmacology approach to explore the mechanisms of Erxian Decoction in polycystic ovary syndrome [J]. *Chin Med*, 2018, 13: 46.
- [10] 王凤雪, 高宇, 刘海波. 中药网络药理学研究流程及代表性数据库工具 [J]. *中国现代中药*, 2021, 23(6): 1111-1118.
- [11] Simmonds W J, Hofmann A F, Theodor E. Absorption of cholesterol from a micellar solution: Intestinal perfusion studies in man [J]. *J Clin Invest*, 1967, 46(5): 874-890.
- [12] Ding X, Zhang W H, Li S, *et al.* The role of cholesterol metabolism in cancer [J]. *Am J Cancer Res*, 2019, 9(2): 219-227.
- [13] Jacob E, Hegele R A. Monogenic versus polygenic forms of hypercholesterolemia and cardiovascular risk: Are there any differences? [J]. *Curr Atheroscler Rep*, 2022, 24(6): 419-426.
- [14] Tietge U J, Groen A K. Role the TICE?: Advancing the concept of transintestinal cholesterol excretion [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2013, 33(7): 1452-1453.
- [15] van der Veen J N, van Dijk T H, Vriens C L, *et al.* Activation of the liver X receptor stimulates *trans*-intestinal excretion of plasma cholesterol [J]. *J Biol Chem*, 2009, 284(29): 19211-19219.
- [16] van der Velde A E, Brufau G, Groen A K. Transintestinal cholesterol efflux [J]. *Curr Opin Lipidol*, 2010, 21(3): 167-171.
- [17] Le May C, Berger J M, Lespina A, *et al.* Transintestinal cholesterol excretion is an active metabolic process modulated by PCSK9 and statin involving ABCB1 [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2013, 33(7): 1484-1493.
- [18] Temel R E, Brown J M. Biliary and nonbiliary contributions to reverse cholesterol transport [J]. *Curr Opin Lipidol*, 2012, 23(2): 85-90.
- [19] Hsieh J, Koseki M, Molusky M M, *et al.* TTC39B deficiency stabilizes LXR reducing both atherosclerosis and steatohepatitis [J]. *Nature*, 2016, 535(7611): 303-307.
- [20] Bovenga F, Sabbà C, Moschetta A. Uncoupling nuclear receptor LXR and cholesterol metabolism in cancer [J]. *Cell Metab*, 2015, 21(4): 517-526.
- [21] Yu X H, Zhang D W, Zheng X L, *et al.* Cholesterol transport system: an integrated cholesterol transport model involved in atherosclerosis [J]. *Prog Lipid Res*, 2019, 73: 65-91.

[责任编辑 李亚楠]