

## • 药理与临床 •

基于多组学研究人参皂苷 Rb<sub>3</sub> 抑制巨噬细胞脂质积累的作用机制

施佳诺<sup>1</sup>, 陈龙<sup>2</sup>, 高艺桐<sup>1</sup>, 陈昱<sup>1</sup>, 雷圆圆<sup>1</sup>, 尹澍<sup>1</sup>, 潘一峰<sup>3\*</sup>, 章丹丹<sup>1\*</sup>

1. 上海中医药大学交叉科学研究院, 上海 201203

2. 上海中医药大学科技实验中心, 上海 201203

3. 上海百洋制药科技有限公司, 上海 200942

**摘要:** 目的 探究人参皂苷 Rb<sub>3</sub> (ginsenoside Rb<sub>3</sub>, Rb<sub>3</sub>) 抑制巨噬细胞脂质积累的分子机制。方法 采用氧化低密度脂蛋白 (oxidized low-density lipoprotein, ox-LDL) 诱导小鼠 RAW264.7 巨噬细胞建立脂质相关巨噬细胞 (lipid-associated macrophages, LAMs) 模型, 给予 Rb<sub>3</sub> 干预后, 通过油红 O 染色及脂滴绿色荧光染色评估细胞内脂质积累情况; 采用非靶向脂质组学分析脂质组成变化; 分别进行转录组学与蛋白质组学检测, 并对多组学结果进行生物信息学整合分析; 利用 Autodock 对 Rb<sub>3</sub> 与多组学交集分子进行分子对接; 通过 qRT-PCR 与 Western blotting 验证关键分子的表达变化; 通过细胞热迁移技术 (cell thermal shift assay, CETSA) 考察 Rb<sub>3</sub> 与补体成分 5a 受体 1 (complement component 5a receptor 1, C5ar1)、白细胞分化抗原 36 (cluster of differentiation 36 antigen, Cd36) 靶点的结合情况。结果 成功构建脂质富集的 LAMs 模型。Rb<sub>3</sub> 在无细胞毒性的剂量范围内呈剂量相关性地抑制细胞内脂质积累 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ 、 $0.001$ )。脂质组学结果显示, 模型组三酰甘油类脂质显著升高, 而甘油磷脂类脂质降低; Rb<sub>3</sub> 处理后表现为三酰甘油类脂质下降、甘油磷脂类脂质升高, 通路富集于甘油磷脂代谢通路。转录组学检测到 1 291 个差异表达基因, 显著富集于过氧化物酶体增殖物激活受体 (peroxisome proliferator-activated receptor, PPAR) 信号通路。蛋白质组学检测到 254 个差异表达蛋白, 通路富集于肌萎缩侧索硬化等相关信号通路。多组学交叉分析得到 Cd36、C5ar1、三磷酸腺苷结合盒转运蛋白 G1 (adenosine triphosphate binding cassette transporter G1, Abcg1) 等 6 个交集分子。分子对接预测 Rb<sub>3</sub> 与 Cd36、C5ar1 和 Abcg1 具有良好的结合潜能。CETSA 结果显示 Rb<sub>3</sub> 可显著保护 Cd36 和 C5ar1 蛋白随温度提高的降解, 表明 Rb<sub>3</sub> 与 Cd36、C5ar1 蛋白存在结合作用。qRT-PCR 与 Western blotting 结果显示, Rb<sub>3</sub> 可显著下调 LAMs 中 Cd36 和 C5ar1 表达 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ 、 $0.001$ ), 同时上调 PPAR $\gamma$ 、Abca1 和 Abcg1 的表达 ( $P < 0.05$ )。结论 Rb<sub>3</sub> 通过激活 PPAR 信号通路和调控甘油磷脂代谢, 靶向 Cd36 和 C5ar1 抑制其介导的脂质摄取, 并促进 Abca1 与 Abcg1 介导的脂质外排, 调控三酰甘油和甘油磷脂的胞内水平, 从而发挥抑制巨噬细胞中脂质积累的作用。

**关键词:** 脂质相关巨噬细胞; 人参皂苷 Rb<sub>3</sub>; 多组学分析; PPAR 信号通路; 甘油磷脂代谢通路; Cd36; C5ar1

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2026)07-2546-12

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2026.07.011

## Mechanism of ginsenoside Rb<sub>3</sub> in inhibiting macrophage lipid accumulation based on multi-omics

SHI Jianuo<sup>1</sup>, CHEN Long<sup>2</sup>, GAO Yitong<sup>1</sup>, CHEN Yu<sup>1</sup>, LEI Yuanyuan<sup>1</sup>, YIN Shu<sup>1</sup>, PAN Yifeng<sup>3</sup>, ZHANG Dandan<sup>1</sup>

1. Interdisciplinary Research Institute of Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China

2. Experiment Center for Science and Technology, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China

3. Shanghai Baheal Pharmaceutical Technology Co., Ltd., Shanghai 20094, China

**Abstract: Objective** To investigate the molecular mechanisms by which ginsenoside Rb<sub>3</sub> (Rb<sub>3</sub>) inhibits lipid accumulation in

收稿日期: 2025-11-21

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (82374116); 国家自然科学基金资助项目 (81773946); 国家自然科学基金资助项目 (81573673); 国家自然科学基金资助项目 (81001666)

作者简介: 施佳诺, 硕士研究生, 主要从事中药干预肿瘤微环境的机制研究。E-mail: sjn12321@163.com

\*通信作者: 潘一峰, 高级工程师, 主要从事中药生产研发及质量标准研究。E-mail: ipanyf@126.com

章丹丹, 研究员, 博士生导师, 主要从事中药干预肿瘤微环境的机制研究。E-mail: izhangdd@126.com

macrophages. **Methods** Oxidized low-density lipoprotein (ox-LDL) was used to induce lipid-associated macrophages (LAMs) model in murine RAW264.7 macrophages. After Rb<sub>3</sub> intervention, intracellular lipid accumulation was evaluated by oil red O staining and BODIPY-based neutral lipid fluorescence staining. Changes in lipid composition were analyzed using untargeted lipidomics. Transcriptomic and proteomic analyses were performed in parallel, followed by integrative multi-omics bioinformatic analysis. Molecular docking was conducted using Autodock to predict the binding potential between Rb<sub>3</sub> and candidate target molecules identified from multi-omics intersections. The expression levels of key genes and proteins were validated by qRT-PCR and Western blotting. Cell thermal shift assay (CETSA) was employed to evaluate the binding of Rb<sub>3</sub> to complement component 5a receptor 1 (C5ar1) and cluster of differentiation 36 antigen (Cd36) targets. **Results** A lipid-enriched LAMs model was successfully established. Within a non-cytotoxic concentration range, Rb<sub>3</sub> dose-dependently suppressed intracellular lipid accumulation ( $P < 0.05, 0.01, 0.001$ ). Lipidomics revealed a marked elevation of triglycerides accompanied by a reduction in glycerophospholipids in model group, whereas Rb<sub>3</sub> treatment significantly reduced triglyceride levels and restored glycerophospholipids, with pathway enrichment mainly involving glycerophospholipid metabolism. Transcriptomic analysis identified 1 291 differentially expressed genes, which were significantly enriched in peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) signaling pathway. Proteomic analysis detected 254 differentially expressed proteins, with enrichment in pathways including amyotrophic lateral sclerosis-related signaling. Integrative multi-omics analysis identified six overlapping target molecules, including Cd36, C5ar1 and adenosine triphosphate binding cassette transporter G1 (Abcg1). Molecular docking predicted favorable binding affinities between Rb<sub>3</sub> and Cd36, C5ar1, Abcg1. CETSA results demonstrated that Rb<sub>3</sub> significantly protected Cd36 and C5ar1 proteins from temperature-dependent degradation, providing further evidence of direct binding between Rb<sub>3</sub> and these targets. qRT-PCR and Western blotting results showed that Rb<sub>3</sub> significantly down-regulated the expressions of Cd36 and C5ar1 in LAMs ( $P < 0.05, 0.01, 0.001$ ), while up-regulated the expressions of PPAR $\gamma$ , Abca1 and Abcg1 ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Rb<sub>3</sub> activates PPAR signaling pathway and regulates glycerophospholipid metabolism, targeting Cd36 and C5ar1 to inhibit their mediated lipid uptake and promote Abca1 and Abcg1 mediated lipid efflux, regulating the intracellular levels of triglycerides and glycerophospholipids, thereby exerting an inhibitory effect on lipid accumulation in macrophages.

**Key words:** lipid-associated macrophages; ginsenoside Rb<sub>3</sub>; multi-omics analysis; PPAR signaling pathway; glycerophospholipid metabolism; Cd36; C5ar1

人参为五加科植物人参 *Panax ginseng* C. A. Mey. 的干燥根和根茎, 具有大补元气、复脉固脱、补脾益肺、生津养血和安神益智的功效<sup>[1-2]</sup>。人参皂苷作为人参的主要有效成分, 已被证实具有免疫调节、抗炎、抗氧化、抗肿瘤等多种药理活性<sup>[3]</sup>。人参皂苷 Rb<sub>3</sub> (ginsenoside Rb<sub>3</sub>, Rb<sub>3</sub>) 广泛存在于人参的根茎及茎叶相关制品中<sup>[4-5]</sup>。既往研究表明, Rb<sub>3</sub> 通过改善线粒体功能、抑制细胞凋亡及减轻氧化应激, 缓解缺血-再灌注损伤并保护心肌细胞, 此外, Rb<sub>3</sub> 还可通过抑制肝脏糖异生、促进脂肪酸氧化等途径改善代谢紊乱<sup>[6-7]</sup>。人参皂苷 Rb<sub>3</sub> 通过过氧化物酶体增殖物激活受体  $\delta$  (peroxisome proliferator-activated receptor  $\delta$ , PPAR $\delta$ )/沉默调节蛋白 6 (silent mating type information regulation 2 homolog 6, SIRT6) 信号通路改善足细胞的氧化应激及炎症反应; 通过 PPAR $\alpha$ /维甲酸 X 受体  $\alpha$  (retinoid X receptor  $\alpha$ , RXR $\alpha$ ) 通路减轻脂肪酸氧化及改善线粒体膜电位以保护心肌细胞<sup>[8-9]</sup>。

动脉粥样硬化是一种以慢性炎症和脂质代谢紊乱为特征的心血管疾病, 其中巨噬细胞异常摄取

氧化低密度脂蛋白 (oxidized low-density lipoprotein, ox-LDL) 并发生脂质蓄积, 是泡沫细胞形成和斑块进展的关键环节。脂质相关巨噬细胞 (lipid-associated macrophages, LAMs) 被认为是动脉粥样硬化及代谢性炎症疾病中的关键细胞亚群, 其形成与功能异常与脂质摄取、外排失衡及多条代谢信号通路密切相关<sup>[10]</sup>。已有研究发现, 人参皂苷 Rd<sub>1</sub> 可通过调节钙离子通道抑制 ox-LDL 内流, 从而减少巨噬细胞脂质摄取并延缓动脉粥样硬化进程<sup>[11]</sup>。然而, 作为结构相近且具有代谢调节潜能的 Rb<sub>3</sub>, 其是否通过调控 LAMs 脂质稳态尚缺乏系统研究。因此, 本研究通过构建 ox-LDL 诱导的 LAMs 模型, 结合非靶向脂质组学、转录组学和蛋白质组学, 从脂质组成变化、基因转录调控及蛋白表达水平多维度系统解析 Rb<sub>3</sub> 对巨噬细胞脂质积累的调控作用及其分子机制, 为阐明 Rb<sub>3</sub> 在动脉粥样硬化相关脂质代谢异常中的潜在作用提供实验依据和理论支持。

## 1 材料

### 1.1 细胞

RAW264.7 小鼠单核巨噬细胞购自中国科学院

典型培养物保藏委员会细胞库,用含10%胎牛血清的RPMI 1640培养基培养。

## 1.2 药品与试剂

Rb<sub>3</sub> (质量分数≥98.0%,批号22072622)购自上海同田生物技术有限公司; ox-LDL (质量浓度为2.2 mg/mL,批号2024-03-20)、油红O染色试剂盒(批号2024-04-25)购自广州奕源生物有限公司; RPMI 1640培养液(批号8123141)购自美国Gibco公司; 胎牛血清(批号102541179)购自美国Sigma-Aldrich公司; CCK-8(批号MA0218-Oct-24I)购自大连美仑生物技术有限公司; 脂滴绿色荧光检测试剂盒(批号081123230904)、NP-40裂解液(批号P0013F)购自上海碧云天生物技术股份有限公司; BCA蛋白浓度测定试剂盒(批号WI333442)、TRIzol RNA提取试剂(批号98597501)、ABI High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit(批号00326305)、蛋白酶及磷酸酶抑制剂(批号WH325778)、乾坤白金SYBR GREEN预混液(批号20230502)购自美国Thermo Fisher Scientific公司; PVDF膜(批号R1CB73920)购自美国Millipore公司; 三磷酸腺苷(adenosine triphosphate, ATP)结合盒转运蛋白G1(ATP binding cassette transporter G1, Abcg1)抗体(批号SH201203X25)、补体成分5a受体1(complement component 5a receptor 1, C5ar1)抗体(批号ASCR1134B)购自苏州百远生物科技有限公司; Cd36抗体(批号23016472)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)抗体(批号00067339)购自美国Proteintech公司; 其他有机溶剂均为分析纯,购自国药集团; 引物由生工生物工程上海股份有限公司合成。

## 1.3 仪器

Quant Studio™ 6Flex型实时荧光定量PCR仪(美国Applied biosystems公司); Tanon NIM2045型凝胶成像系统(上海天能科技有限公司); Spark 10M型多功能酶标仪(瑞士TECAN公司); Cytation 5型细胞成像微孔板检测系统(美国BioTek公司); Orbi-Trap Elite型赛默飞组合式质谱仪、fusionlumos型赛默飞纳米电喷雾电离色谱-质谱联用仪(美国Thermo Fisher Scientific公司)。

## 1.4 数据库与软件

Metabolomics Workbench网站(<https://www.metabolomicsworkbench.org/>); LIPEA网站(<https://hyperlipea.org/home>); 微生信网站([\[biinformatics.com.cn\]\(https://www.biinformatics.com.cn\)\); TCMSP数据库\(<https://www.tcmsp-e.com/>\); PDB数据库\(<https://www.rcsb.org/>\); AlphaFold数据库\(<https://alphafold.ebi.ac.uk/>\); Simca 14.1软件; Adobe Illustrator 2025软件; Graphpad Prism 9.5软件; PyMOL 2.2.0-0软件; Autodock 4.2.6软件; Image J软件。](https://www.</a></p></div><div data-bbox=)

## 2 方法

### 2.1 LAMs模型的建立和脂质积累检测

**2.1.1 细胞活力检测** 采用CCK-8检测试剂盒考察Rb<sub>3</sub>对巨噬细胞活力的影响。将对数生长期的RAW264.7细胞以 $1 \times 10^4$ 个/孔接种于96孔板中,培养过夜,用含Rb<sub>3</sub>(25、50、100 μmol/L)的无血清培养基处理24 h<sup>[12]</sup>。对照组加入不含药物的培养基,另设置未接种细胞的空白组。加入含10% CCK-8溶液的无血清培养基,孵育2 h。用酶标仪在450 nm处测量各孔的吸光度(A)值,计算细胞存活率。

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

**2.1.2 油红O染色检测脂质积累** 设置对照组、模型组和Rb<sub>3</sub>低、高剂量(50、100 μmol/L)组,用含50 μg/mL ox-LDL的无血清培养基诱导巨噬细胞建立LAMs模型<sup>[13]</sup>,给药组再加入Rb<sub>3</sub>处理24 h。弃去培养液,4%多聚甲醛固定20 min,60%异丙醇浸洗15 s,加入油红O染液染色20 min,纯水洗滌后于倒置显微镜下拍照,观察脂质积累变化。

**2.1.3 脂滴绿色荧光染色检测脂质积累** 按“2.1.2”项下方法进行分组和给药,按照脂滴绿色荧光检测试剂盒步骤,检测各组细胞中脂质积累的变化。细胞用4%多聚甲醛固定15 min,加入Staining Solution避光孵育20 min,洗涤后于cytation仪器GFP模式下拍照,并于 $E_x/E_m$ (488 nm/525 nm,  $E_x$ 代表激发,  $E_m$ 代表发射)下检测发光强度。

### 2.2 非靶向脂质代谢组学分析

按“2.1.2”项下方法进行分组和给药,用预冷的PBS刮下细胞,800 r/min离心5 min,与氯仿-甲醇(2:1)混合,涡旋,4 °C、12 000 r/min离心10 min。取下层有机相,重复操作,使用真空离心干燥。加入甲醇-异丙醇(1:1)混合物复溶,4 °C、12 000 r/min离心10 min,吸取上清进行脂质组学分析。按照课题组前期研究的方法<sup>[14]</sup>,采用高分辨率液相色谱-质谱(LC-MS)检测和分析主要脂质。

在脂质代谢组学分析得到的结果中,以变量权重值(variable importance for projection, VIP) > 1、 $P < 0.05$ 、差异倍数(fold change, FC) > 2 或 <

0.5 为条件筛选脂质代谢物, 选择对照组 vs 模型组与模型组 vs Rb<sub>3</sub> 高剂量组同时满足上述筛选条件的差异脂质, 将其导入 LIPEA 网站进行通路富集分析。

### 2.3 转录组学测序和分析

按“2.1.2”项下方法进行分组和给药, 收集细胞, 加入 Trizol 试剂后送样检测。使用 MJzol Animal RNA Isolation Kit 进行总 RNA 的提取, 使用 RNAClean XP Kit 和 RNase-Free DNase Set 进行纯化。对纯化后的总 RNA 进行 mRNA 的分离、片段化、第一链 cDNA 合成、第二链 cDNA 合成、末端修复、3'末端加 A、连接接头、富集等步骤, 完成 mRNA 测序文库的构建。根据文库的有效浓度及数据产出需求进行测序。使用 Illumina NovaSeq 6000 测序平台, 采用 PE150 测序模式, 使用 Cel Ranger 4.0.0 软件和 Cellranger aggr 插件对数据归一化, 进行主成分分析 (principal components analysis, PCA) 和无监督聚类。使用 Seqtk 过滤原始数据, 使用 Hisat 2.2.0.4 进行基因组对比, 使用 Stringtie 软件统计每个基因内的片段数量, 并采用 TMM 算法进行标准化处理。使用 edgeR 进行 mRNA 差异表达分析。

在转录组学分析得到的结果中, 以  $P < 0.05$ 、 $FC > 2$  或  $< 0.5$  为条件筛选差异表达基因, 选择对照组 vs 模型组与模型组 vs Rb<sub>3</sub> 高剂量组同时满足上述筛选条件的差异表达基因, 将其导入微生信进行通路富集分析。

### 2.4 蛋白质组学分析

按“2.1.2”项下方法进行分组和给药, 收集细胞, 按照文献方法进行样品处理和检测<sup>[15]</sup>。加入尿素与 2% SDS 裂解细胞蛋白, 超声破碎后 4 °C、13 000 r/min 离心 20 min, 吸取上清, 使用 BCA 试剂盒测定蛋白浓度, 加入 6 倍体积的冰丙酮沉淀蛋白, -20 °C 沉淀过夜后, 4 °C、13 000 r/min 离心 15 min, 沉淀加预冷洗液洗涤 2 次, 于通风橱风干至半干状态。加入盐酸胍复溶沉淀, 4 °C、13 000 r/min 离心 10 min, 取上清测定蛋白浓度。使用巯基乙醇溶液还原蛋白, 加入 IAM 溶液烷基化蛋白质, 使用超滤管收集基化后的蛋白, 加入胰酶, 37 °C 摇床 90 r/min 反应过夜, 收集肽段进行脱盐处理, 1% 甲酸水溶液复溶样品后上机检测。采用纳米电喷雾液相色谱质谱 (Nano-ESI-LC-MS) 检测蛋白, 进行数据库鉴定与定量。

在蛋白质组学分析得到的结果中, 以  $P < 0.05$ 、

$FC > 2$  或  $< 0.5$  为条件筛选差异表达蛋白, 选择对照组 vs 模型组与模型组 vs Rb<sub>3</sub> 高剂量组同时满足上述筛选条件的差异表达蛋白, 使用微生信进行通路富集分析。

### 2.5 Rb<sub>3</sub> 与关键靶点的分子对接

从 TCMSP 数据库下载 Rb<sub>3</sub> 的 mol2 格式, 从 PDB 数据库获取 C5ar1 (PDB ID: 8HPT)、Abcg1 (PDB ID: 7R8C) 的三维结构, 使用 AlphaFold 数据库对 Cd36 的三维结构进行计算建模, 使用 Autodockvina 计算 Rb<sub>3</sub> 与蛋白的结合能, 使用 PyMOL 2.2.0 软件显示对接结果。当结合能  $\leq -5$  kcal/mol (1 kcal/mol = 4.182 kJ/mol) 时, 结合活性良好。

### 2.6 分子验证

**2.6.1 qRT-PCR 分析** 按“2.1.2”项下方法进行分组和给药, 收集细胞, 按照试剂盒说明书提取总 RNA 并合成 cDNA, 进行 qRT-PCR 分析。引物序列见表 1, 采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法计算目的基因的表达量。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

基因	引物序列 (5'-3')
<i>Cd36</i>	F: ATGGGCTGTGATCGGAAGCTG R: TTTGCCACGTCATCTGGGTTT
<i>Abca1</i>	F: GCAGATCAAGCATCCCAACT R: CCAGAGAATGTTTCATTGTCCA
<i>Abcg1</i>	F: GAAGTGGCATCAGGGGAGTA R: AAAGAAACGGGTTACATCG
<i>C5ar1</i>	F: GATGCCACCGCCTGTATAGT R: ACGGTCGGCACTAATGGTAG
<i>PPAR<math>\gamma</math></i>	F: GCCAAGGTGCTCCAGAAGATGAC R: GTGAAGGCTCATGTCTGTCTCTGTG
<i>GAPDH</i>	F: AACGGATTTGGTCGTATTGGG R: CAGGGGTGCTAAGCAGTTGG

**2.6.2 Western blotting 分析** 按“2.1.2”项下方法进行分组和给药, 收集细胞, 用含 1% 磷酸酶抑制剂的 RIPA 裂解总蛋白, 并进行蛋白定量。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, 封闭后, 分别加入 Cd36 (1 : 5 000)、C5ar1 (1 : 1 000)、Abcg1 (1 : 500) 和 GAPDH (1 : 5 000) 抗体, 4 °C 孵育过夜; 洗膜后, 室温孵育二抗 (1 : 5 000), 加入 ECL 化学发光试剂显影, 使用 Image J 软件分析条带的灰度值。

**2.6.3 细胞热位移实验 (cellular thermal shift assay, CETSA)** 选择生长状态良好的 RAW264.7 细胞, 离心后加入含 1% 磷酸酶抑制剂的 PBS, 使用液氮

速冻、水浴 37 °C 解冻裂解细胞，离心后进行蛋白定量。将上清分为 2 份，分别为对照组（0.1% 二甲亚砜）和 Rb<sub>3</sub>（100 μmol/L）组，室温孵育 1 h 后分别分为 4 份，分别于逆转录仪 42、52、62、72 °C 处理 3 min，提取蛋白，按“2.6.2”项下方法检测 Cd36 和 C5ar1 蛋白表达。

### 2.7 统计学分析

使用 Graphpad Prism 9.5 软件进行统计分析和绘图，数据以  $\bar{x} \pm s$  表示，使用单因素方差分析进行多组间数据样本比较。

## 3 结果

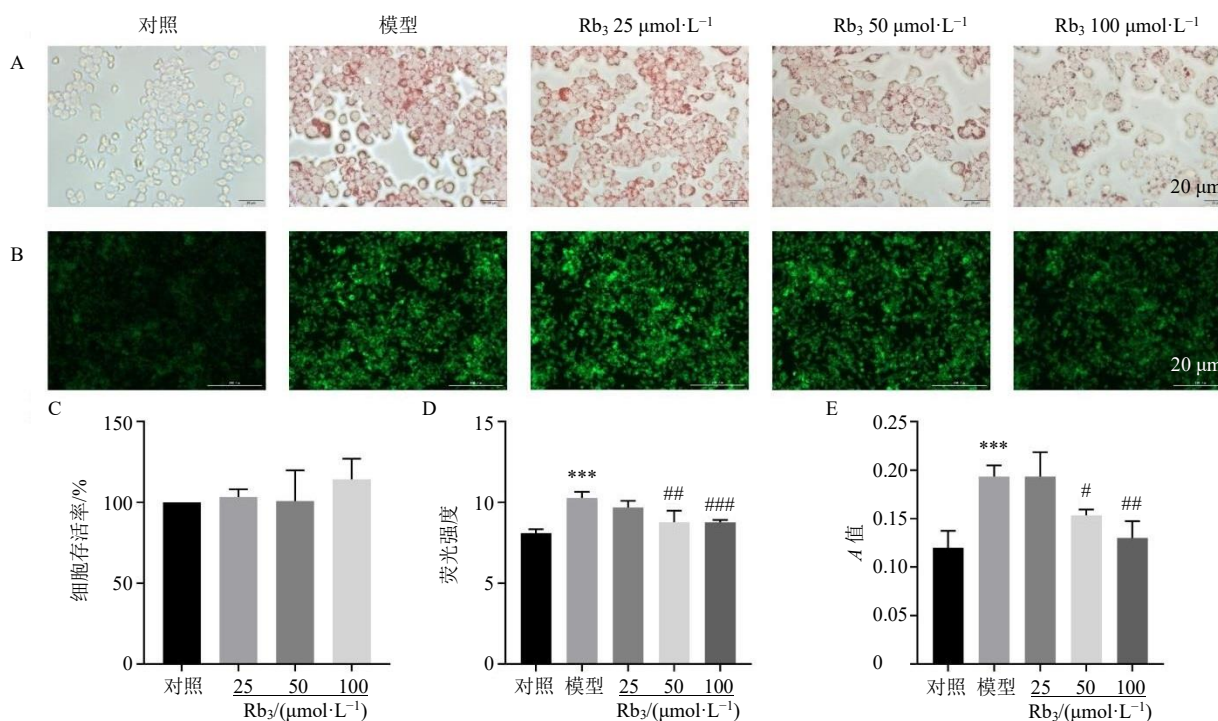
### 3.1 Rb<sub>3</sub> 抑制 LAMs 细胞中的脂质积累

CCK-8 结果（图 1-C）显示，Rb<sub>3</sub>（25、50、100 μmol/L）对 RAW264.7 细胞无明显毒性。绿色脂滴及油红 O 染色结果（图 1-A、B、D、E）显示，经 ox-LDL 诱导后，巨噬细胞内的脂质积累明显升高（ $P < 0.001$ ），表明 LAMs 模型造模成功；与模型组比较，Rb<sub>3</sub> 50、100 μmol/L 给药后显著抑制 LAMs

中的脂质积累（ $P < 0.05$ 、0.01、0.001），且呈剂量相关性，Rb<sub>3</sub> 25 μmol/L 给药后与模型组无显著性差异，故后续实验以 Rb<sub>3</sub> 50、100 μmol/L 的剂量给药。

### 3.2 脂质组学差异脂质与生信分析

PCA 结果（图 2-A）显示，模型组与 Rb<sub>3</sub> 低剂量组在同一象限，与对照组、Rb<sub>3</sub> 高剂量组分居不同象限，组内样本聚集分布，提示对照组、模型组、Rb<sub>3</sub> 高剂量组脂质成分区分明显。火山图（图 2-B、C）显示对照组 vs 模型组与模型组 vs Rb<sub>3</sub> 高剂量组脂质分子整体 FC 情况，以  $FC > 2$  或  $< 0.5$ 、 $P < 0.05$  筛选差异脂质。弦图（图 2-D、E）及热图（图 3-B）显示组间脂质变化的聚类，可见大部分甘油磷脂差异脂质水平在造模后提高，Rb<sub>3</sub> 处理后降低；大部分甘油磷脂差异脂质水平在造模后提高，Rb<sub>3</sub> 处理后降低，提示 LAM 造模后细胞发生脂质紊乱，而 Rb<sub>3</sub> 干预后能逆转脂质紊乱。将差异脂质导入 LIPEA 网站进行通路富集分析，以  $P < 0.05$  为筛选标准，差异最为显著的是甘油磷脂通路（图 3-A）。

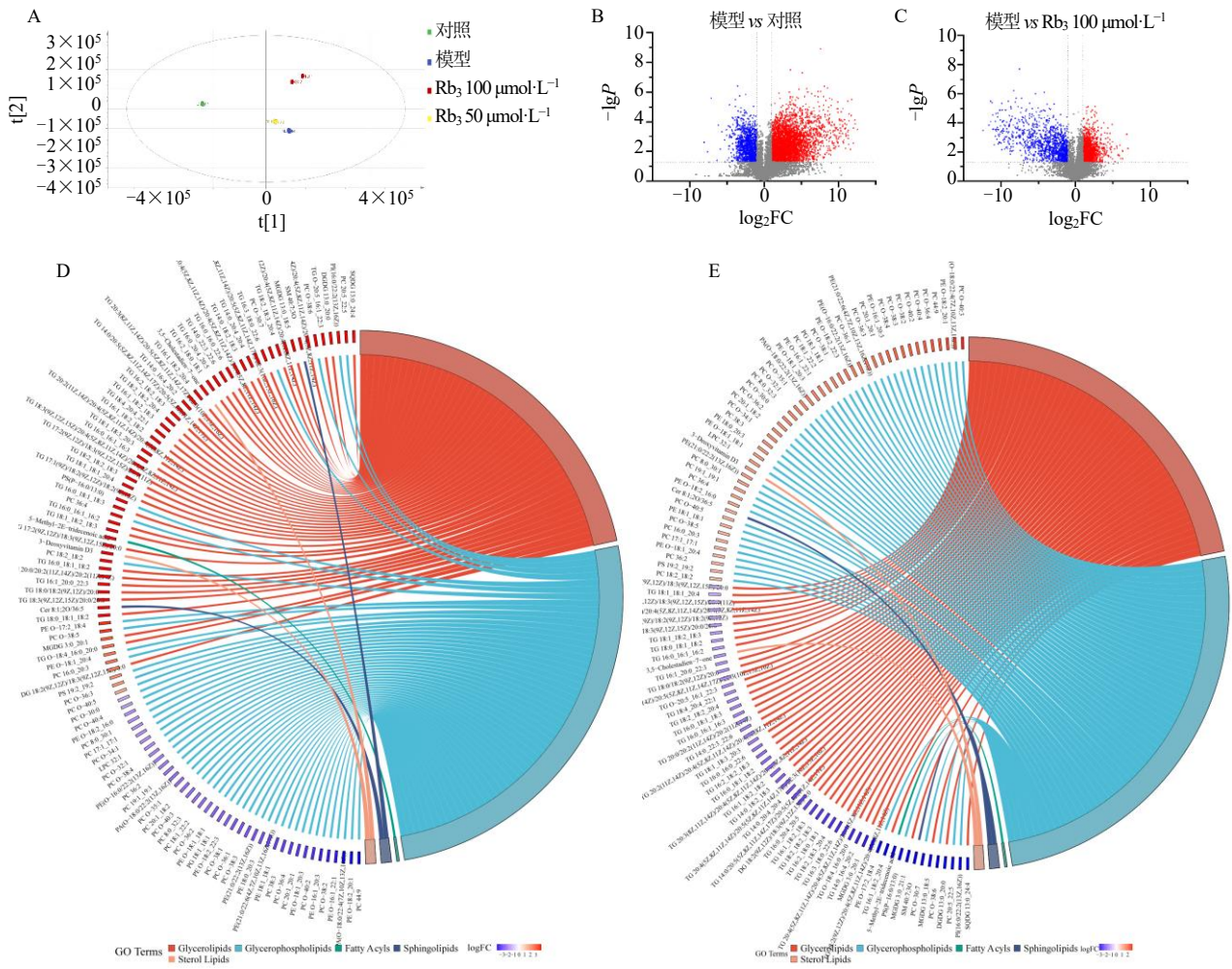


A、E-油红 O 染色检测各组脂质积累 (×400)；B、D-绿色荧光脂滴染色检测各组脂质积累 (×100)；C-CCK-8 检测 Rb<sub>3</sub> 的细胞毒性；与对照组比较：\* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$  \*\*\* $P < 0.001$ ；与模型组比较：# $P < 0.05$  ## $P < 0.01$  ### $P < 0.001$ ，图 7、8 同。

A, E-lipid accumulation in each group detected by oil O red staining (× 400); B, D-lipid accumulation in each group detected by BODIPY lipid droplet staining (× 100); C-cytotoxicity of Rb<sub>3</sub> detected by CCK-8; \* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$  \*\*\* $P < 0.001$  vs control group; # $P < 0.05$  ## $P < 0.01$  ### $P < 0.001$  vs model group, same as Figs. 7, 8.

图 1 Rb<sub>3</sub> 抑制 LAMs 细胞中的脂质积累 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )

Fig. 1 Rb<sub>3</sub> inhibited lipid accumulation in LAMs ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )



A-PCA图; B、C-差异脂质火山图; D、E-差异脂质弦图。

A-PCA diagram; B, C-differential lipid volcano map; D, E-different lipid string diagram.

图2 脂质代谢组学分析

Fig. 2 Lipid metabolomics analysis

### 3.3 转录组学差异表达基因及生信分析

如图4所示,以 $FC > 2$ 或 $< 0.5$ 、 $P < 0.05$ 筛选差异表达基因,结果如图4-A、B所示,对照组 vs 模型组有1 291个差异表达基因,模型组 vs  $Rb_3$ 高剂量组有1 083个差异表达基因,3组共有601个交集基因,其中256个交集基因在模型组上调,在 $Rb_3$ 高剂量组下调;341个交集基因在模型组下调,在 $Rb_3$ 高剂量组上调。对上述601个差异表达基因进行基因本体(gene ontology, GO)分析,结果见图4-D,生物过程注释表明差异基因与对外部刺激的负调控反应、防御反应的负调控、羧酸生物合成等相关;细胞成分注释表明差异基因主要与液泡膜、极化生长位点、前突触等相关;分子功能注释分析表明差异基因主要与抗氧化活性、钙离子跨膜转运蛋白活性、钙通道活性等相关。京都基因与基

因组百科全书(Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)通路结果(图4-C)显示,交集基因富集于PPAR信号通路、谷胱甘肽代谢、胞葬作用等<sup>[16]</sup>。

### 3.4 蛋白质组学中差异表达蛋白及生信分析

如图5所示,以 $FC > 2$ 或 $< 0.5$ 、 $P < 0.05$ 筛选差异表达蛋白,结果如图5-A、B所示,对照组 vs 模型组有510个差异表达蛋白,模型组 vs  $Rb_3$ 高剂量组有434个差异表达蛋白,3组共有254个交集蛋白,其中116个交集蛋白在模型组上调而在 $Rb_3$ 高剂量组下调,138个交集蛋白在模型组下调而在 $Rb_3$ 高剂量组上调。对对照组、模型组和 $Rb_3$ 高剂量组共有的254个差异表达蛋白进行GO分析,结果见图5-D,生物过程注释表明差异表达蛋白与含蛋白质复合物组装的调控、细胞内运输调控、肌动

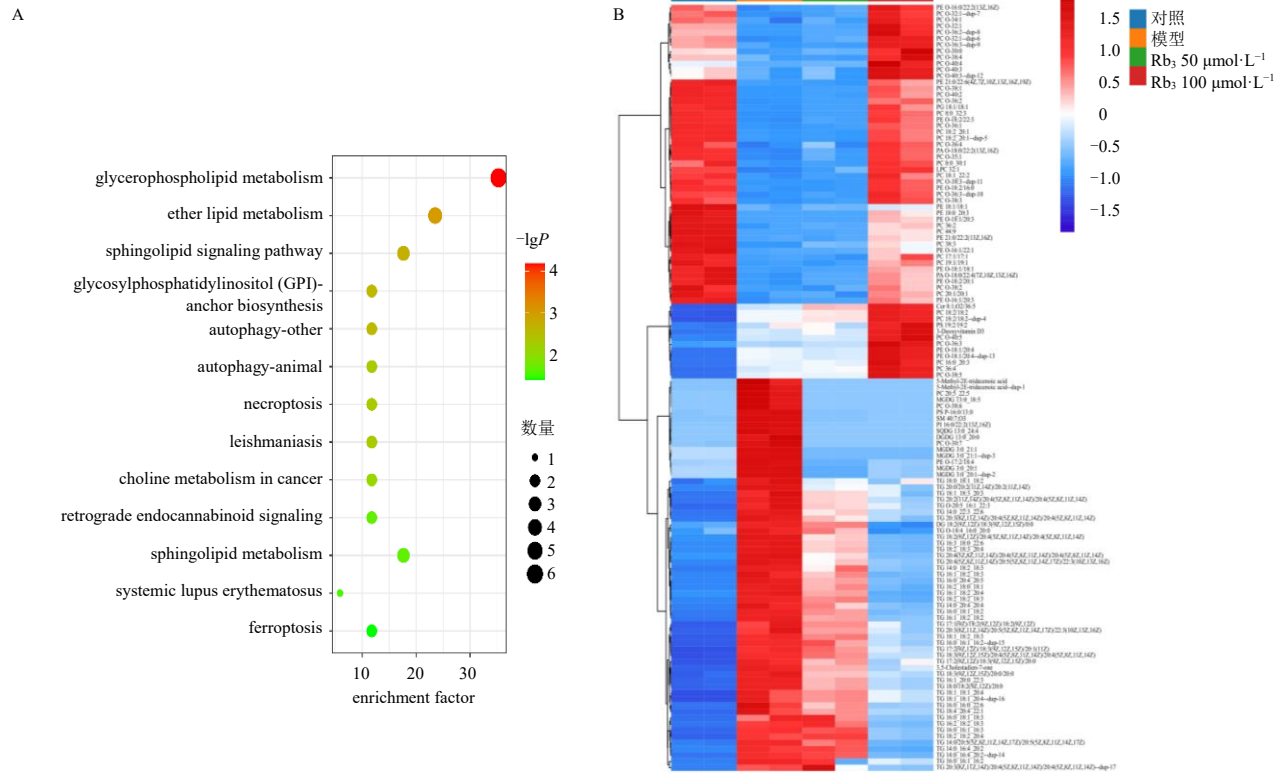
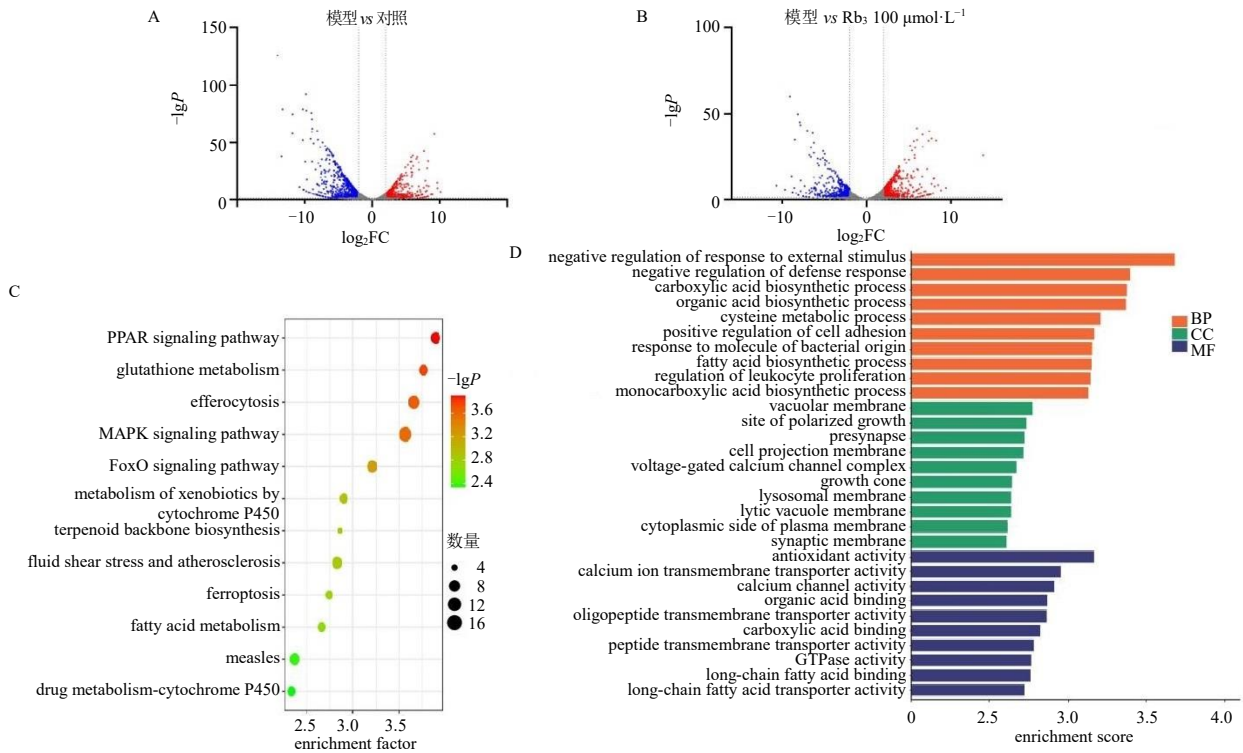


图3 差异脂质通路富集分析 (A) 及热图 (B)

Fig. 3 Differential lipid pathway enrichment analysis (A) and heat map (B)

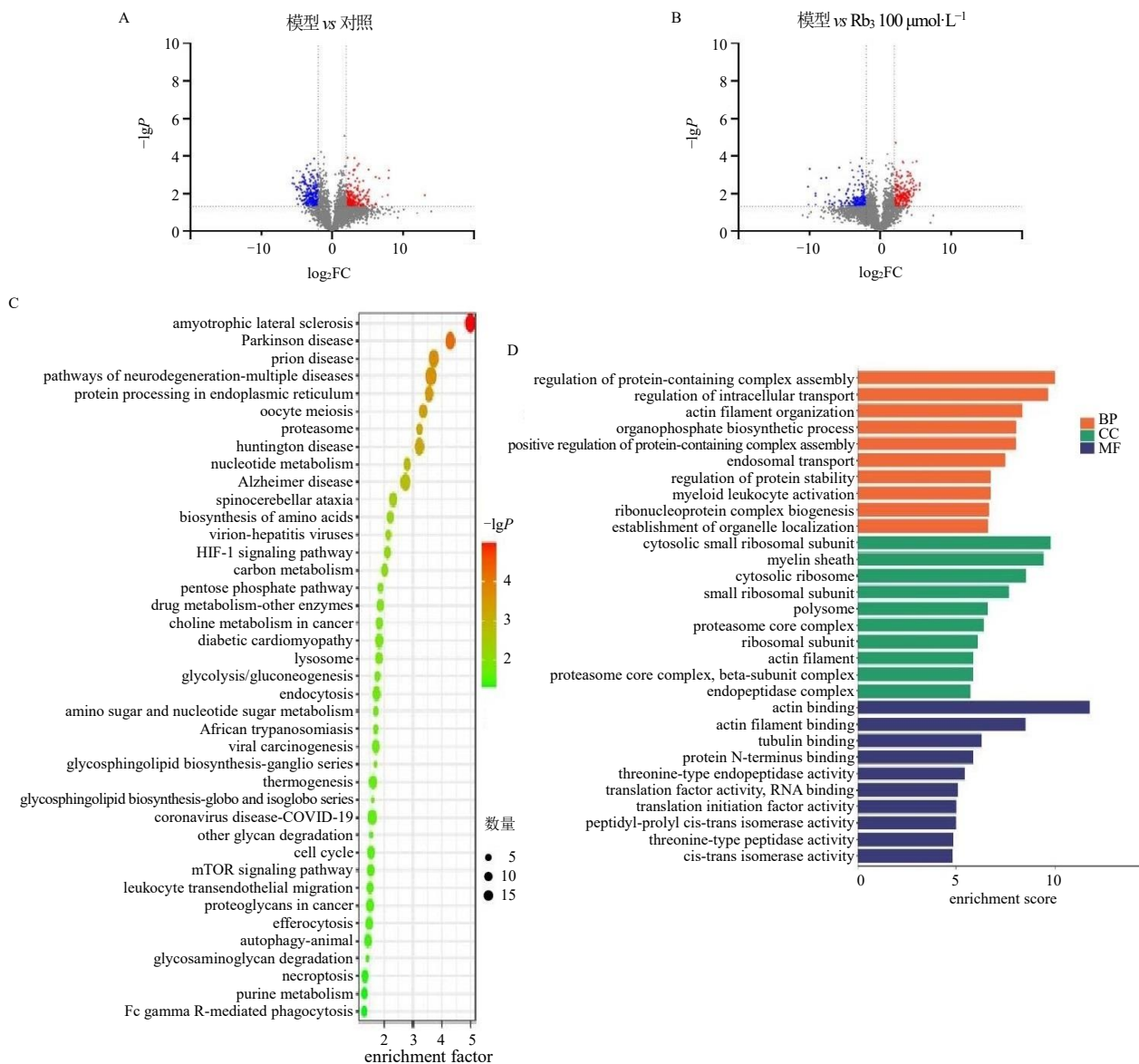


A、B-差异表达基因火山图；C-差异表达基因 KEGG 通路富集分析气泡图；D-差异表达基因 GO 功能注释分析。

A, B-volcano map of differential expressed gene; C-KEGG pathway enrichment analysis bubble plot of differential expressed gene; D-GO function annotation analysis of differential expressed gene.

图4 转录组学分析

Fig. 4 Transcriptome analysis



A、B-差异表达蛋白火山图；C-差异表达蛋白 KEGG 通路富集分析气泡图；D-差异表达蛋白 GO 功能注释分析。

A, B-volcano map of differential expressed protein; C-KEGG pathway enrichment analysis bubble diagram of differential expressed protein; D-GO functional annotation analysis of differential expressed proteins.

图 5 蛋白质组学分析

Fig. 5 Proteomic analysis

蛋白丝组织等相关；细胞成分注释表明与细胞质小核糖体亚基、髓鞘、细胞质核糖体等相关；分子功能注释分析表明与肌动蛋白结合、肌动蛋白丝结合、微管蛋白结合等相关。KEGG 通路结果（图 5-C）显示，差异表达蛋白富集于肌萎缩侧索硬化、帕金森病、朊病毒病等主要通路。

### 3.5 分子对接

如图 6-A 所示，蛋白质组学与转录组学共有 C5ar1、Cd36、Abcg1、含 EH 结构域 1（EH domain containing 1, Ehd1）、补体因子备解素（complement

factor properdin, Cfp）、氨基己糖苷酶 B（hexosaminidase B, Hexb）6 个交集靶点，其中，C5ar1、Cd36 和 Abcg1 与脂质代谢密切相关。分子对接结果（图 6-B~D）显示，Cd36、C5ar1、Abcg1 与 Rb3 结合能均低于 -5 kcal/mol，具有良好的潜在结合活性。

### 3.6 qRT-PCR 及 Western blotting 验证组学交集靶点的表达

如图 7 所示，与对照组比较，模型组 Cd36、C5ar1 基因及蛋白表达水平显著升高（ $P < 0.05$ 、

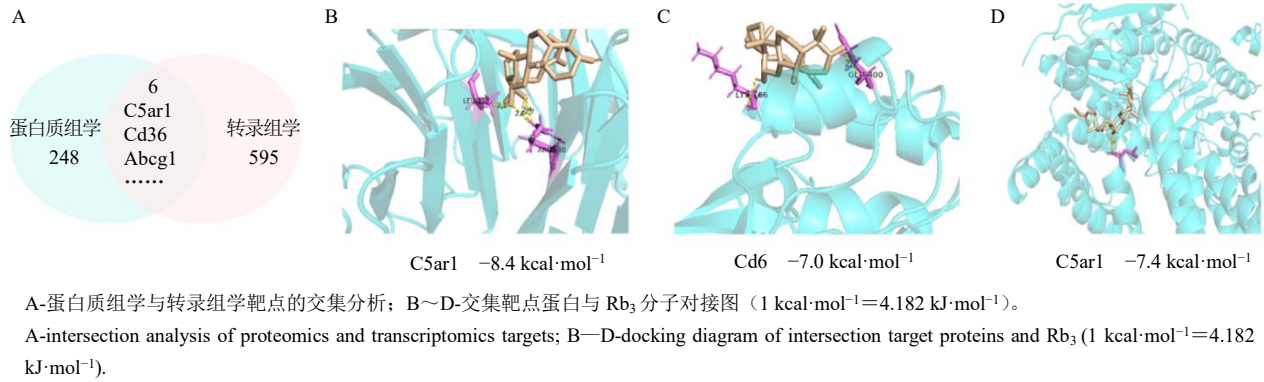


图6 交集靶点与 Rb<sub>3</sub> 的分子对接结果

Fig. 6 Molecular docking results of intersection targets with Rb<sub>3</sub>

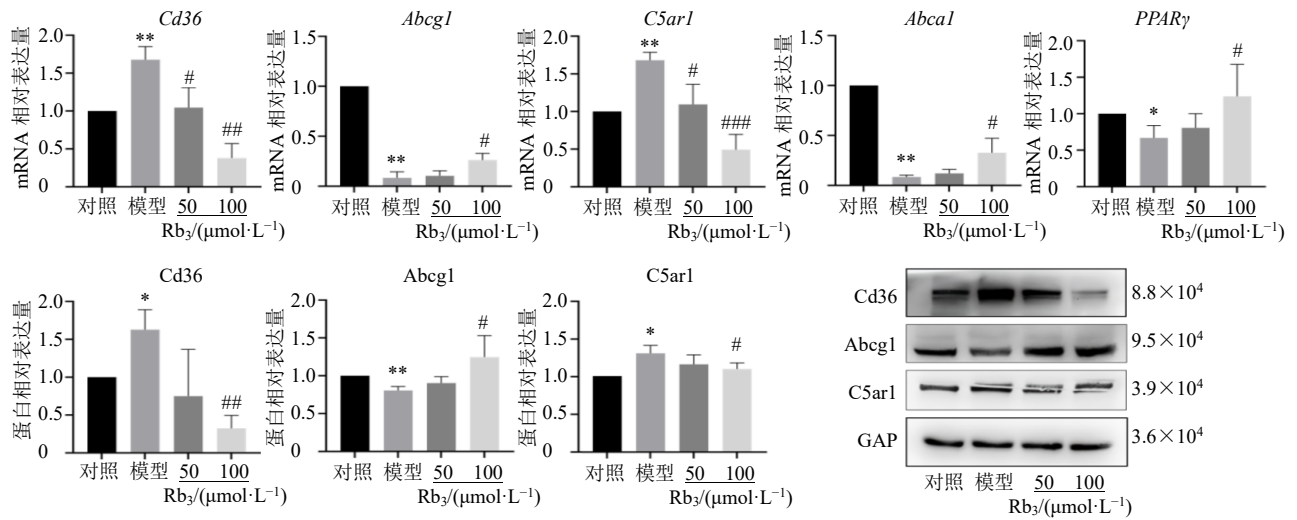


图7 qRT-PCR (A) 及 Western blotting (B) 验证组学交集靶点的表达 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 7 Expressions of omics intersection targets verified by qRT-PCR (A) and Western blotting (B) ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

0.01), *Abcg1* 基因及蛋白表达水平显著降低 ( $P < 0.01$ ), *Abca1*、*PPARγ* 基因表达水平显著降低 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ ); 与模型组比较, *Rb<sub>3</sub>* 高剂量组 *Cd36*、*C5ar1* 基因及蛋白表达水平显著降低 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ 、 $0.001$ ), *Abcg1* 基因及蛋白表达水平显著升高 ( $P < 0.05$ ), *Abca1*、*PPARγ* 基因表达水平显著升高 ( $P < 0.05$ ), *Rb<sub>3</sub>* 低剂量组 *Cd36*、*C5ar1* 基因表达水平显著降低 ( $P < 0.05$ )。

### 3.7 CETSA 考察 Rb<sub>3</sub> 与 Cd36、C5ar1 蛋白的结合情况

如图 8 所示, 随温度提高, *Cd36* 和 *C5ar1* 蛋白条带均有降解趋势。在相同温度下, 与对照组比较, *Rb<sub>3</sub>* 处理后 *Cd36* 和 *C5ar1* 的蛋白表达水平显著升高 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ ), 表明 *Rb<sub>3</sub>* 和 *Cd36*、*C5ar1* 存在结合作用, 能够提高蛋白的热稳定性而抑制其随温度提高的降解。

## 4 讨论

LAMs 是一类在脂质代谢应激条件下形成的特殊巨噬细胞亚群, 其典型特征为细胞内胆固醇和三酰甘油等脂质大量蓄积, 并伴随 *Cd36*、髓系细胞触发受体 2 (triggering receptor expressed on myeloid cells 2, *Trem2*)、载脂蛋白 E (apolipoprotein E, *ApoE*) 等脂质代谢相关基因的高表达<sup>[17-19]</sup>。LAMs 通过 *Cd36* 等清道夫受体介导脂质摄取, 在泡沫细胞形成、炎症反应放大及动脉粥样硬化进展中发挥关键作用<sup>[10]</sup>。本研究结果显示, *ox-LDL* 可显著诱导 RAW264.7 细胞形成具有脂质富集特征的 LAMs, 而 *Rb<sub>3</sub>* 处理可有效抑制该进程, 提示 *Rb<sub>3</sub>* 能干预 LAMs 的形成及其脂质稳态失衡。结合转录/蛋白/脂质组学分析和实验验证中 *Rb<sub>3</sub>* 下调 *Cd36* 和 *C5ar1* 表达并促进 *Abcg1*、*Abca1* 和 *PPARγ* 表达的结果, 提示 *Rb<sub>3</sub>* 可能通过激活 LAMs 中 *PPAR* 通路调控脂

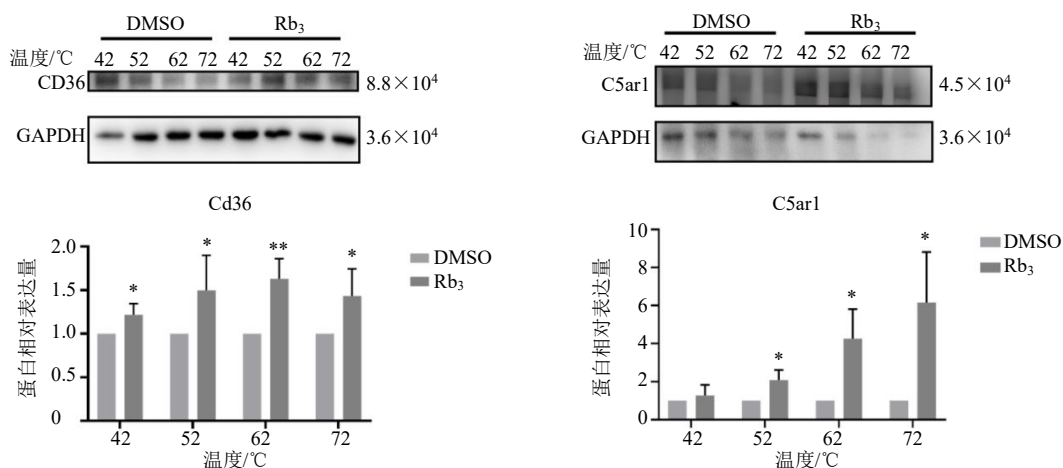


图 8 CETSA 考察 Rb<sub>3</sub> 与 Cd36、C5ar1 蛋白的结合情况 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 8 Binding of Rb<sub>3</sub> to Cd36 and C5ar1 proteins verified by CETSA ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

质摄取-外排平衡,从而减轻胞内三酰甘油的蓄积和恢复甘油磷脂水平,揭示了 Rb<sub>3</sub> 调控巨噬细胞脂质代谢的分子机制,为其作为干预脂质代谢紊乱及动脉粥样硬化的潜在天然活性成分提供了部分理论依据。

从脂质组学层面,本研究发现巨噬细胞吸收 ox-LDL 引起脂质代谢紊乱, LAMs 细胞中三酰甘油蓄积,而磷脂水平显著下调,与油红 O 染色与脂滴荧光染色发现的脂质积累表型相符,也与文献报道一致<sup>[11,20]</sup>。Rb<sub>3</sub> 处理后显著提高甘油磷脂和降低三酰甘油水平,细胞染色发现逆转了细胞内的脂质积累。脂质组学的结果提示 Rb<sub>3</sub> 主要通过甘油磷脂通路调节磷脂和三酰甘油的胞内水平,重塑脂质代谢的平衡。甘油磷脂代谢与转录组学富集的 PPAR 信号通路联系紧密,甘油磷脂代谢的产物能够参与脂质外排与脂质转运至线粒体进行 β-氧化,PPAR 通路也能调控甘油磷脂合成基因维持细胞膜稳态<sup>[21]</sup>。

从转录/蛋白质组学层面,双组学交集分子 Cd36、Abcg1 和 C5ar1 与脂质代谢紧密相关。清道夫受体 Cd36 是巨噬细胞摄取 ox-LDL 最重要的分子,能够特异性结合 ox-LDL 的氧化磷脂部位并内化,并对下游多种分子产生信号,摄入的 ox-LDL 超过巨噬细胞外排能力时,巨噬细胞即转变为脂质相关巨噬细胞<sup>[22]</sup>。C5ar1 作为补体系统活化的产物,能够激活炎症因子白细胞介素-1β (interleukin-1β, IL-1β)、肿瘤坏死因子-α (tumor necrosis factor-α, TNF-α) 发挥促炎作用,促进动脉粥样硬化及肿瘤

的发展,巨噬细胞 C5ar1 通过促进 IL-1β 产生而加速泡沫细胞相关斑块进展;敲除或药物抑制 C5ar1 可显著减轻高脂饮食所致的动脉粥样硬化病变<sup>[23]</sup>。Abcg1 及 Abca1 是巨噬细胞重要的脂质外排蛋白,分别介导脂质以高密度脂蛋白 HDL、载脂蛋白 ApoA-I 的形式排出,占巨噬细胞外排脂质的 70%,脂质相关巨噬细胞的形成也伴随着 Abca1、Abcg1 的失活及脂质的外排而减少<sup>[24]</sup>。本研究的分子对接结果显示 Rb<sub>3</sub> 与 Cd36、C5ar1 和 Abcg1 均有良好的结合能力;CETSA 结果显示 Rb<sub>3</sub> 靶向结合 Cd36 和 C5ar1 提高蛋白的热稳定性。Rb<sub>3</sub> 抑制 LAMs 中 Cd36 的表达而降低 ox-LDL 的摄入;同时提高 Abca1 和 Abcg1 表达来促进脂质外排;并降低 C5ar1 的表达进一步抑制炎症反应。

转录组学中 KEGG 分析发现 Rb<sub>3</sub> 干预 LAMs 的通路富集于 PPAR 信号通路。PPARs 是核激素受体超家族成员,包含 PPARα、PPARβ/δ 和 PPARγ 3 种亚型,通过与 RXR 形成异二聚体结合靶基因的 PPAR 反应元件调控转录,参与脂肪形成、糖脂代谢、炎症及细胞能量代谢等生物过程。PPARγ 通过上调肝脏 X 受体促进胆固醇的流出, LXR 能够提高 Abca1 和 Abcg1 的表达促进脂质外排,PPARγ 还能通过抑制核因子-κB 活性来减少炎症<sup>[24-25]</sup>。本研究发现 Rb<sub>3</sub> 提高 PPARγ 的表达调控该通路而逆转脂质相关巨噬细胞的形成。

本研究通过脂质组学、转录组学和蛋白质组学揭示了 Rb<sub>3</sub> 干预 LAMs 脂质代谢的多层级特征变化,且多组学交叉分析的结果在功能层面具有内在

一致性。脂质组学结果显示, ox-LDL 诱导的 LAMs 中三酰甘油显著升高, 而甘油磷脂类明显下降; 相应地, 转录组学和蛋白质组学分析提示脂质摄取、外排及脂代谢调控的 PPAR 信号通路发生显著改变。从具体机制上看, 三酰甘油在巨噬细胞内的异常积累通常与脂质摄取增强及脂质外排受阻密切相关。本研究中, LAMs 模型显著上调了 Cd36 和 C5ar1 等脂质摄取相关分子, 而 Abca1、Abcg1 和 PPAR $\gamma$  等介导脂质外排及代谢稳态的分子表达下降, 与脂质组学中观察到的三酰甘油升高和甘油磷脂减少相一致。Rb<sub>3</sub> 处理后, 上述分子表达变化得到逆转, 同时伴随三酰甘油下降和甘油磷脂回升, 提示 Rb<sub>3</sub> 可能通过重塑“脂质摄取-外排平衡”来调控细胞内脂质组成。此外, 转录组富集的 PPAR 信号通路在生物学功能上高度相关。PPAR $\gamma$  被认为是连接脂肪酸代谢、脂质转运及膜磷脂稳态的关键转录调控因子, 其激活可促进 Abca1/Abcg1 介导的胆固醇和磷脂外排, 并抑制脂质过度积累。因此, Rb<sub>3</sub> 可能通过激活 PPAR 信号通路, 协同调控脂质代谢相关基因表达, 从而在脂质分子层面表现为三酰甘油减少和甘油磷脂恢复。

综上, Rb<sub>3</sub> 通过调控 PPAR 通路, 抑制脂质摄取的 Cd36 和促炎性 C5ar1 的表达, 同时提高脂质外排的 Abcg1、Abca1 的表达, 抑制三酰甘油和提高磷脂水平, 改善 ox-LDL 引发的脂质代谢紊乱而抑制巨噬细胞向 LAMs 的转变, 为靶向 LAMs 治疗脂代谢疾病的天然调控剂的开发提供候选物。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

#### 参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2025: 8.
- [2] 胡亚欣, 曲美澄, 赵艳, 等. 基于网络药理学和分子对接技术探究人参治疗焦虑症的作用机制 [J]. 现代药物与临床, 2025, 40(11): 2717-2724.
- [3] 周凯璐. 人参皂苷的酶转化及其抗炎活性研究 [D]. 长春: 长春中医药大学, 2024.
- [4] 刘志, 阮长春, 刘志天, 等. HPLC 法同时测定林下参、鲜人参、生晒参和红参中 14 种人参皂苷 [J]. 中草药, 2012, 43(12): 2431-2434.
- [5] 郭冲, 郜玉钢, 臧埔, 等. HPLC 法同时测定人参及其制剂中 16 种人参皂苷 [J]. 中草药, 2014, 45(14): 2009-2013.
- [6] 陈健文, 谭敏谊, 陈浩凡, 等. 人参皂苷 Rb<sub>3</sub> 对脑缺血-再灌注后大鼠脑组织中兴奋性氨基酸的作用研究 [J]. 中草药, 2012, 35(8): 1301-1304.
- [7] Fan W X, Huang Y L, Zheng H, et al. Ginsenosides for the treatment of metabolic syndrome and cardiovascular diseases: Pharmacology and mechanisms [J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 132: 110915.
- [8] Oh H, Cho W, Park S Y, et al. Ginsenoside Rb<sub>3</sub> ameliorates podocyte injury under hyperlipidemic conditions via PPAR $\delta$ - or SIRT6-mediated suppression of inflammation and oxidative stress [J]. *J Ginseng Res*, 2023, 47(3): 400-407.
- [9] Chen X, Wang Q Y, Shao M Y, et al. Ginsenoside Rb<sub>3</sub> regulates energy metabolism and apoptosis in cardiomyocytes via activating PPAR $\alpha$  pathway [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 120: 109487.
- [10] 樊碧娆, 姚伟娟. 氧化型低密度脂蛋白受体在动脉粥样硬化发病机制中的作用 [J]. 中国病理生理杂志, 2020, 36(10): 1897-1901.
- [11] Li J, Xie Z Z, Tang Y B, et al. Ginsenoside-Rd, a purified component from *Panax notoginseng* saponins, prevents atherosclerosis in ApoE knockout mice [J]. *Eur J Pharmacol*, 2011, 652(1/3): 104-110.
- [12] Xu H L, Liu M, Chen G H, et al. Anti-inflammatory effects of ginsenoside Rb<sub>3</sub> in LPS-induced macrophages through direct inhibition of TLR4 signaling pathway [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 714554.
- [13] Dib L, Koneva L A, Edsfieldt A, et al. Lipid-associated macrophages transition to an inflammatory state in human atherosclerosis increasing the risk of cerebrovascular complications [J]. *Nat Cardiovasc Res*, 2023, 2(7): 656-672.
- [14] Fang T, Jiang Y X, Chen L, et al. Coix Seed oil exerts an anti-triple-negative breast cancer effect by disrupting miR-205/S1PR1 axis [J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11: 529962.
- [15] 袁春露, 陈龙, 廖雅芳, 等. 乳腺癌骨转移的蛋白质组学特性及代谢途径活化研究 [J]. 中国肿瘤临床, 2024, 51(13): 695-702.
- [16] 操映倩, 周立分, 余宏, 等. 基于转录组学和蛋白质组学分析小檗碱抗糖尿病慢性炎症机制 [J]. 中国新药杂志, 2021, 30(5): 424-433.
- [17] Jaitin D A, Adlung L, Thaiss C A, et al. Lipid-associated macrophages control metabolic homeostasis in a Trem2-dependent manner [J]. *Cell*, 2019, 178(3): 686-698.
- [18] Xu R N, Vujić N, Bianco V, et al. Lipid-associated macrophages between aggravation and alleviation of metabolic diseases [J]. *Trends Endocrinol Metab*, 2024, 35(11): 981-995.
- [19] Marelli G, Morina N, Portale F, et al. Lipid-loaded macrophages as new therapeutic target in cancer [J]. *J*

- Immunother Cancer*, 2022, 10(7): e004584.
- [20] 汪增钰, 刘宝红, 乔亮, 等. 非靶向脂质组学揭示巨噬细胞泡沫化进程脂质代谢功能失调 [J]. 高等学校化学学报, 2024, 45(11): 116-124.
- [21] 李荣荣, 杜航, 李航, 等. 基于临床疗效挖掘和靶点网络验证的二陈汤治疗高脂血症燥湿化痰功效研究 [J]. 中草药, 2024, 55(8): 2708-2722.
- [22] Silverstein R L, Li W, Park Y M, *et al.* Mechanisms of cell signaling by the scavenger receptor CD36: Implications in atherosclerosis and thrombosis [J]. *Trans Am Clin Climatol Assoc*, 2010, 121: 206-220.
- [23] Selle J, Asare Y, Köhncke J, *et al.* Atheroprotective role of C5ar2 deficiency in apolipoprotein E-deficient mice [J]. *Thromb Haemost*, 2015, 114(4): 848-858.
- [24] Zheng S S, Huang H, Li Y Z, *et al.* Yin-Xing-Tong-Mai Decoction attenuates atherosclerosis via activating PPAR $\gamma$ -LXR $\alpha$ -ABCA1/ABCG1 pathway [J]. *Pharmacol Res*, 2021, 169: 105639.
- [25] Le M P T, Marasinghe C K, Je J Y. Chitosan oligosaccharides: A potential therapeutic agent for inhibiting foam cell formation in atherosclerosis [J]. *Int J Biol Macromol*, 2024, 282(Pt 4): 137186.

[责任编辑 李亚楠]