

引用:明慧,王青虎,何祥,伊力奇.基于网络药理学预测柳蒿芽脂溶性部位的降血脂作用及实验验证[J].中医药导报,2025,31(4):53-59.

基于网络药理学预测柳蒿芽脂溶性部位的降血脂作用及实验验证*

明 慧,王青虎,何 祥,伊力奇

(内蒙古民族大学蒙医药学院,内蒙古 通辽 028000)

[摘要] 目的:探讨柳蒿芽脂溶性部位(LPAI)对高脂血症(HLP)的降血脂作用。方法:通过Swiss Target Prediction和SEA数据库对LPAI中收集的20个化学成分进行靶点预测,在TTD和GeneCards中获取HLP靶点。利用微生信对基因进行匹配并绘制韦恩图,获得LPAI治疗HLP的潜在靶标。通过String网站绘制靶蛋白PPI网络图,通过Metascape数据库进行基因本体论(GO)富集分析和京都基因与基因百科全书(KEGG)通路富集分析。利用Cytoscape 3.6.0软件构建药物-靶点-作用通路网络。采用LPAI干预以FFA诱导L-02细胞脂肪变性模型对核心靶点和通路进行验证,观察LPAI对L-02细胞增殖、细胞内脂滴及甘油三酯(TG)含量的影响,并用Western blotting检测关键通路中过氧化物酶体增殖物激活受体 α (PPAR α)和脂蛋白脂酶(LPL)蛋白的表达水平。结果:筛选得到LPAI与HLP关联的潜在靶点84个。GO功能富集分析获得662个条目,其中生物过程614条,分子功能31条,细胞组分17条。KEGG通路富集分析显示,LPAI治疗HLP的主要信号通路包括PPAR信号通路、胰岛素抵抗、脂肪细胞因子信号通路等。CCK-8实验显示,LPAI可抑制FFA诱导的L-02细胞增殖,并与剂量和时间有依赖性。油红O染色实验显示,LPAI低、中、高剂量组细胞内脂滴分布在细胞膜边缘,累积数量逐渐减少,且细胞内脂滴伴有不同程度的改善现象。模型组TG含量高于对照组($P<0.01$);LPAI中、高剂量组TG含量低于模型组($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。模型组PPAR α 和LPL蛋白相对表达量低于对照组($P<0.01$ 或 $P<0.05$);LPAI低、中、高剂量组LPL蛋白相对表达量高于模型组($P<0.05$);LPAI中剂量组PPAR α 蛋白相对表达量高于模型组($P<0.05$)。结论:LPAI具有降血脂作用,可通过调控PPAR信号通路,抑制FFA诱导的L-02细胞中PPAR α 和LPL蛋白表达。

[关键词] 高脂血症;柳蒿芽;脂溶性部位;网络药理学;降血脂

[中图分类号] R285.5;R589.2 [文献标识码] A [文章编号] 1672-951X(2025)04-0053-07

DOI:10.13862/j.cn43-1446/r.2025.04.009

Prediction and Validation of Hypolipidemic Effect of Liposoluble Parts from Artemisia Integrifolia Based on Network Pharmacology

Minghui, WANG Qinghu, HE Xiang, Yiliqi

(School of Mongolian Medicine and Pharmacy, Inner Mongolia Minzu University,

Tongliao Inner Mongolia 028000, China)

[Abstract] Objective: To investigate the hypolipidemic effect of liposoluble parts from Artemisia integrifolia (LPAI). Methods: The target prediction of 20 chemical components collected from LPAI was carried out by Swiss Target Prediction and SEA database, and the hyperlipidemia (HLP) targets were obtained in TTD and GeneCards. The potential targets of LPAI for the treatment of HLP were obtained by using bioinformatics to match genes and draw Venn diagrams. The PPI network diagram was constructed on String website, and Gene Ontology (GO) enrichment analysis and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway enrichment analysis were carried out through Metascape database. The Cytoscape 3.6.0 Software was used to build the network of compounds-targets-pathways for LPAI against HLP. Then, the core targets and pathways were preliminarily verified by the in vitro experiment of L-02 cell steatosis model induced by FFA after the

*基金项目:内蒙古自治区科技计划项目(2019GG118);蒙药研发国家地方联合工程研究中心开放基金项目(MDK2023040)

通信作者:王青虎,男,教授,研究方向为蒙药有效物质基础及其药理研究

intervention of LPAI. The effects of LPAI on proliferation of L-02 cells, the content of cell lactone drops and triglyceride (TG) were investigated, and Western blotting was used to detect expression of peroxisome proliferator activated receptor α (PPAR α) and lipoprotein lipase (LPL). Results: Totally 84 potential targets that LPAI associated with HLP were screened. The functional enrichment analysis of GO obtained 662 GO items, including 614 biological processes, 31 molecular functions and 17 cellular components. KEGG pathway enrichment analysis showed that the main signal pathways of LPAI in the treatment of HLP include PPAR signal pathway, insulin resistance, adipocytokine signal pathway and so on. CCK-8 experiment showed that LPAI could reduce the proliferation of L-02 cells induced by FFA, which was dependent on dose and time. Oil red O staining experiment showed that the intracellular lipid droplets were distributed at the edge of cell membrane in LPAI low, medium and high dose groups, and that the cumulative number gradually decreased, accompanied by the improvement of different progress. The model groups showed higher TG content than control group ($P<0.01$). The LPAI medium and high dose groups showed lower TG content than model group ($P<0.05$ and $P<0.01$). The model group showed lower expression levels of PPAR α and LPL than control group ($P<0.01$ and $P<0.05$); The LPAI low, medium and high dose groups showed higher expression levels of LPL protein than model group ($P<0.05$), the LPAI medium dose group showed higher expression of PPAR α protein than model group ($P<0.05$). Conclusion: LPAI can reduce blood lipid and inhibit the expression of PPAR α and LPL in FFA-induced L-02 cells by regulating PPAR signal pathway.

[Keywords] hyperlipidemia; *Artemisia integrifolia*; liposoluble parts; network pharmacology; hypolipidemic effect

高脂血症(hyperlipidemia, HLP)可直接引起一些严重危害人体健康的疾病,如动脉粥样硬化、冠心病、胰腺炎等^[1]。目前, HLP患者占正常人群的20%~40%,并且随着人们生活水平的提高及生活习惯的改变,发病率逐渐上升^[2]。HLP的临床治疗以西药为主,虽然疗效显著,但往往存在一定的不良反应和副作用^[3]。采用中药、蒙药、藏药等天然药物^[4-6]预防和治疗该病,提前防治后续并发症(如动脉粥样硬化、心脑血管疾病),逐渐成为学术界研究的重点和热点。

柳蒿芽系菊科多年生草本植物柳蒿(*Artemisia integrifolia* Linn.)的嫩芽,也是内蒙古呼伦贝尔地区达斡尔民族的特色菜肴——“库木勒”。柳蒿芽营养丰富,被认为是“清热解酒”“降血脂”的绿色蔬菜^[7]。柳蒿芽不但可食用,亦可全草入药。柳蒿芽味苦、性寒,具有消炎、清热解毒、降脂、降糖及降血压等作用^[8]。然而,柳蒿芽治疗高脂血症的研究未见报道。课题组对柳蒿芽脂溶性部位(LPAI)的前期研究^[9]发现其能调节血清中甘油三酯(triglyceride, TG)、总胆固醇(total cholesterol, TC)、高密度脂蛋白胆固醇(high density lipoprotein cholesterol, HDL-C)和低密度脂蛋白胆固醇(low density lipoprotein cholesterol, LDL-C)的水平。本研究采用网络药理学预测LPAI治疗高脂血症的作用靶点及信号通路,同时通过体外实验进行核心靶点和通路的验证,探讨LPAI对高脂血症的降血脂作用机制。

1 材料与方法

1.1 数据库与软件 Chem Draw 14.0 绘图软件, Open Babel-3.1.1 软件, String 数据库(<https://string-db.org/>), SEA 数据库(<http://sea.bkslab.org/>), Swiss Target Prediction 数据库(<http://www.swisstargetprediction.ch/>), Uniprot 数据库(<http://www.uniprot.org/>), TTD 数据库(<http://bidd.nus.edu.sg/group/cjttd/>), Gene cards 数据库(<http://www.Genecards.org>), 微生物平台(<http://www.bioinformatics.com.cn/>), Cytoscape 3.6.0 软件, Metascape 数据库(<http://metascape.org/>)。

1.2 LPAI 化学成分的获得 本课题组从LPAI中分离鉴定化学成分^[10],并结合文献[11-13]收集其化学成分。利用化学绘图软件Chem Draw 14.0对收集到的化学成分进行化学结构式的绘制并保存mol2文件,再用Open Babel-3.1.1软件转换成SMILES格式进行保存备用。

1.3 LPAI与HLP潜在靶点的获得 将以上获得的SMILES格式文件导入SEA和Swiss Target Prediction数据库,搜索LPAI化学成分相关靶点,并运用Uniprot数据库对以上收集的LPAI化学成分靶点名称统一转化为基因名称。在TTD数据库和GeneCards数据库搜索框中输入“Hyperlipidaemia”“dyslipidemia”,检索HLP靶点,去除Score值<所有HLP靶点的中位数的基因,删除重复靶点以获得HLP靶点。将LPAI相关靶点和HLP靶点进行匹配映射,并利用微生物绘制韦恩图(Venn),获得LPAI治疗HLP的潜在作用靶点。

1.4 化学成分-高脂血症靶点网络模型的构建和分析 将以上韦恩图中获得的潜在作用靶点相关信息导入Cytoscape 3.6.0软件,构建“化学成分-疾病靶点”相互作用网络图,使用Network Analyzer功能对LPAI的主要活性成分进行分析。

1.5 PPI网络的构建和分析 将韦恩图中获得的潜在作用靶点输入到String数据库(<https://string-db.org/>),设置物种为“Homo sapiens”进行搜索,以蛋白相互作用综合得分>0.9作

为筛选条件,以获得蛋白相互作用关系,去掉游离节点,运用Cytoscape 3.6.0绘制靶蛋白PPI网络图,获得核心基因。

1.6 基因本体论(GO)富集分析和京都基因与基因百科全书(KEGG)通路富集分析 采用Metascape数据库(<http://metascape.org/>),物种选择人,对核心基因进行GO富集分析和KEGG通路富集以阐明核心基因在信号通路中的作用,并根据通路富集结果获得相应的 P 值,选择 $P<0.01$ 的排序前20的通路,然后再利用作图工具将获得的KEGG通路制作成气泡图。

1.7 体外实验验证

1.7.1 实验材料

1.7.1.1 实验细胞 L-02细胞(人正常肝细胞;批号:SNL-141)由内蒙古民族大学教育部重点实验室提供,经本实验室传代后-80℃保存。

1.7.1.2 主要试剂 CCK-8试剂盒(批号:240008005)、胎牛血清(批号:2020010501)、RPMI-1640培养基(批号:6124132)、双抗(批号:2020010501);胰蛋白酶(批号:2764740)、PBS缓冲液(批号:24135607H)、油酸钠(批号:C21PA89025A)、棕榈酸钠(批号:C21PA882500B)及油红O试剂盒(批号:20220919)均购自北京索莱宝科技有限公司;BCA蛋白浓度测定试剂盒(批号:16924)、蛋白干粉(批号:AR0104)、RIPA裂解液(批号:SB-BR040)、PVDF膜(批号:0000297020)、SDS-PAGE凝胶制备试剂盒(批号:AR0138)、TBS-T漂洗缓冲液(批号:AR0195)、SDS-PAGE蛋白上样缓冲液5X(变性,批号:AR1112)、Tris-glycine-SDS电泳缓冲液(1×液体,批号:AR1146)、Tris-glycine-SDS转印缓冲液(1×液体,批号:16C05A46)、Anti-GAPDH Antibody(批号:BM3874)、Anti-ALPLA Antibody(批号:A010081-1)及HRP Conjugated(批号:BA1054)均购自武汉博士德生物工程有限公司;PPAR α 抗体(批号:Abs139883)购自内蒙古古道有限公司。

LPAI由本课题组自制。方法:柳蒿芽20 kg,用二氯甲烷回流提取,提取液回收二氯甲烷,得到二氯甲烷提取物。二氯甲烷提取物用石油醚上柱,经石油醚洗脱至洗脱液无色为止,再用石油醚、乙酸乙酯混合液[V(石油醚):V(乙酸乙酯)=40:1]洗脱。石油醚、乙酸乙酯混合液[V(石油醚):V(乙酸乙酯)=40:1]减压回收,浓缩膏为柳蒿芽亲脂性部位。

1.7.1.3 主要仪器 Q36639倒置显微镜(北京元中锐科集成检测技术有限公司);HW-2漩涡混合器(金坛市大地自动化仪器厂);iChem-340全自动生化分析仪(深圳库贝尔生物科技股份有限公司);FUSION FX凝胶成像系统(北京五洲东方科技发展有限公司);DYY-6D电泳仪电源、DYCP-40D电转仪、DYCZ-24DN垂直电泳仪均购自北京六一仪器厂;TY-80A/S脱色摇床(常州荣华仪器制造有限公司);CMAXPLUS多功能酶标仪(上海美谷分子仪器有限公司);TGEar离心机(天根生化有限公司);DT5-5低温自动平衡离心机(北京时代北利离心机有限公司)。

1.7.2 L-02细胞培养 在细胞培养箱中,将人正常肝细胞L-02置于完全培养基(10%胎牛血清及1%双抗的RPMI-1640)

中进行培养。培养环境:37℃,5% CO₂,饱和湿度。注意观察培养液有无变色、变混,同时显微镜下了解细胞生长状态。每隔2 d应用胰蛋白酶消化细胞,进行传代处理,实验所需的细胞应是处于对数生长期人肝细胞。

1.7.3 诱导液的制备 精密称取油酸钠30.4 mg和棕榈酸钠28.0 mg,分别溶于2 mL PBS和2 mL甲醇溶液中,得到50 mmol/L油酸钠和50 mmol/L棕榈酸钠的母液。将两种母液用RPMI-1640培养液稀释至1 mmol/L,再将1 mmol/L的油酸钠和棕榈酸钠溶液以2:1体积比进行混合制备,得到脂肪变性诱导液(Fat denaturation inducing fluid, FFA)。

1.7.4 L-02细胞增殖抑制率 取对数生长期L-02细胞,消化离心重悬后,接种于96孔板中,5×10³个/孔,过夜贴壁。实验分为空白组(无细胞的等量培养液)、对照组(无FFA,无LPAI)、模型组(1 mmol/L的FFA)及给药组(1 mmol/L FFA+125、250、500、1 000、2 000、4 000 μ g/mL LPAI)。每孔终体积100 μ L,每组6个复孔,分别培养24、48、72 h后,每孔加入10 μ L的CCK-8溶液,培养箱内37℃继续孵育4 h。使用酶标仪于450 nm处检测各孔的吸光度(A),计算细胞增殖抑制率。细胞增殖抑制率=[1-(A_{给药组}-A_{空白组})/(A_{模型组}-A_{空白组})]×100%。

1.7.5 油红O染色观察细胞内脂滴 取对数生长期L-02细胞,消化离心重悬后,接种于6孔板中,1.2×10⁶个/孔,过夜贴壁,将细胞分为对照组(无FFA,无LPAI)、模型组(1 mmol/L FFA)、LPAI低剂量组(1 mmol/L FFA+250 μ g/mL LPAI)、LPAI中剂量组(1 mmol/L FFA+1 000 μ g/mL LPAI)、LPAI高剂量组(1 mmol/L FFA+2 000 μ g/mL LPAI)。培养24 h后,各组均吸弃培养基,PBS洗3次,弃去。用0.4%的多聚甲醛室温固定20 min,弃去,按油红O染色液试剂盒说明书进行操作,放大40倍镜检并拍照。

1.7.6 细胞上清液中TG测定 按“1.7.5”项下分组、干预,培养细胞24 h贴壁后,收集细胞上清液。细胞上清液1 000 r/min离心(离心半径为15 cm,温度为4℃)5 min,取上清液,再采用全自动生化检测仪检测TG含量。

1.7.7 Western blotting法检测PPAR α 和LPL蛋白表达水平 按“1.7.5”项下分组、干预,培养24 h后,利用全蛋白提取试剂盒提取细胞蛋白,BCA法测定各组中蛋白质浓度。每组25 μ g蛋白上样,SDS-PAGE电泳分离蛋白,转移至PVDF膜上,室温5%脱脂奶粉封闭2 h,TBST洗膜3次,4℃,PPAR α (1:1 000)、LPL(1:1 000)、GAPDH(1:2 000)一抗孵育过夜。次日TBST洗膜,加入二抗室温孵育2 h,TBST洗膜3次,10 min/次。洗好PVDF膜后,正面朝上放在显影仪中,滴加ECL化学发光液即可成像,观察目的条带形状,分析蛋白表达差异。

1.7.8 统计学方法 采用SPSS 29.0软件进行数据分析,计量资料以“均数±标准差”($\bar{x}\pm s$)表示,计量资料符合正态分布且方差齐,采用单因素方差分析, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 化学成分 共收集到20个化学成分,其名称、编号、结构类型及文献来源见表1。20个化学成分中倍半萜11个、炔类3个、

脂肪酸5个、苯丙素1个。

表1 化学成分基本信息

编号	名称	结构类型	文献来源
LHY1	母菊萸	倍半萜	[11]
LHY2	acetylenes (E)-2	炔类	[11]
LHY3	acetylenes (E)-3	炔类	[11]
LHY4	acetylenes (E)-4	炔类	[11]
LHY5	(+)-(S)-二氢姜黄素	倍半萜	[12]
LHY6	(+)-(S)-姜黄素	倍半萜	[12]
LHY7	(+)-(S)-二氢姜黄酮	倍半萜	[12]
LHY8	(+)-(S)-姜黄酮	倍半萜	[12]
LHY9	3,5,8a-三甲基-3a,6,7,8a,9b-六氢-3H,4H-萘并[2,3b]呋喃-2,8-二酮	倍半萜	[10]
LHY10	8-异丙基-4a-甲基-5-氧代-3,4,4a,5,6,7,8,8a-八氢萘-2-甲醛	倍半萜	[10]
LHY11	4-异丙基-1-甲基-7-亚甲基八氢萘-1,4a-二醇	倍半萜	[10]
LHY12	6-羟基-3-异丙基-4a,5-二甲基-2,3,4-4a,8,8a-六氢萘-1,7-二酮	倍半萜	[10]
LHY13	artefrigin	倍半萜	[13]
LHY14	丁香酚	苯丙素	[11]
LHY15	棕榈酸	脂肪酸	[11]
LHY16	油酸	脂肪酸	[11]
LHY17	亚油酸	脂肪酸	[11]
LHY18	亚麻酸	脂肪酸	[11]
LHY19	12,13-环氧亚麻酸	脂肪酸	[11]
LHY20	integracid	倍半萜	[12]

2.2 LPAI与HLP潜在靶点的获得 在TTD数据库中获取32个HLP相关靶点, Gene cards数据库中获取652个HLP相关靶点。去除重复基因,共筛选出661个HLP相关基因。将HLP相关靶点与LPAI化学成分预测的靶基因进行匹配映射,并利用微生物绘制韦恩图,获得84个潜在靶点。(见图1)

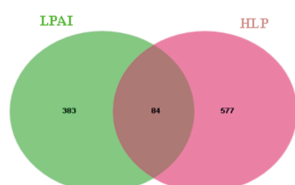


图1 LPAI-HLP靶点韦恩图

2.3 LPAI-化学成分-HLP靶点网络构建和分析 将以已获取的84个潜在靶点导入Cytoscape 3.6.0软件构建化学成分-HLP靶点网络。(见图2)网络图共包括101个节点,290条边。绿色节点代表靶点,蓝色节点代表化学成分,红色代表药物,边则表示活性成分与靶点的相互作用关系。Degree值排名第1的化合物是油酸与31个靶点相互作用,排名第2的化合物有亚油酸、亚麻酸和6,7-环氧-亚麻酸与29个靶点相互作用,排名第3的化合物是棕榈酸与28个靶点相互作用。

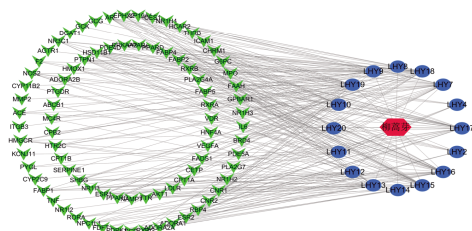


图2 化学成分-HLP靶点网络

2.4 PPI网络的构建和分析 通过String数据平台将84个潜

在靶点导入,以获得相互作用关系,再使用Cytoscape 3.6.1绘制靶蛋白PPI网络图。(见图3)该网络图包括84个节点,556条边,平均节点Degree值13.2, PPI富集 P 值 $<1.0 \times 10^{-6}$,其中Degree值越大则节点越大。根据Degree ≥ 10 的节点制作出关键蛋白质节点。(见图4)排列前10的靶点基因有RAC- α 丝氨酸/苏氨酸-蛋白激酶、白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)、过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (peroxisome proliferator activated receptor γ , PPAR γ)、肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)、血管内皮生长因子A(vascular endothelial growth factor A, VEGFA)、PPARA、胰高血糖素(glucagon, GCG)、低密度脂蛋白受体(low density lipoprotein receptor, LDLR)、血管紧张素转换酶(angiotensin-converting enzyme, ACE)、核受体亚家庭1H组成员4(nuclear receptor subfamily 1, group H, member 4, NR1H4)。这些靶点基因在治疗HLP中具有重要意义,其中PPARA与脂质代谢密切相关,是重要作用靶点之一。激活PPARA通路是治疗HLP的重要方法。中药活性成分对PPARA激活程度良好,在降低不良反应的同时能达到预期疗效^[14]。因此,作为天然PPARA配体激活剂的中药活性降脂成分的研究日益受到关注。

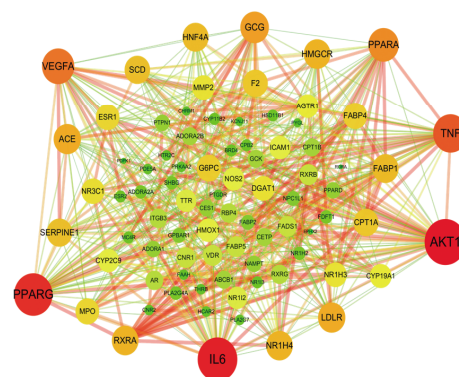


图3 LPAI治疗HLP相关靶点的PPI网络

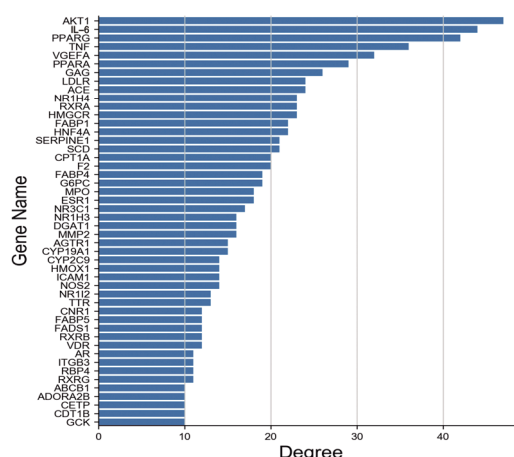


图4 LPAI干预HLP的核心靶点 (Degree ≥ 10)

2.5 GO和KEGG分析 将LPAI治疗HLP的84个潜在靶点导入Metascape数据库进行GO功能富集和KEGG通路分析。根据 $P < 0.005$, count ≥ 5 筛选条目,共获得662个GO条目,其中生物过程(biological process, BP)614条,分子功能(molecular function, MF)31条,细胞组分(cellular component, CC)17条。将 P 值前8位的个GO条目以柱状图呈现。(见图5)生物过程主要包

括脂质定位、转运和代谢过程的调节,胆固醇代谢过程,以及激素水平的调节等;分子功能主要包括脂质结合、核受体活性、转录因子结合和羧酸结合;细胞组分主要包括受体复合物、RNA聚合酶Ⅱ转录因子复合物、细胞膜。

KEGG通路分析共获得60条信号通路,根据P值排序筛选出前20条KEGG信号通路进行气泡图展示。(见图6)LPAI治疗HLP的信号通路包括PPAR信号通路、胰岛素抵抗、脂肪细胞因子信号通路、癌症的途径、神经活性配体受体相互作用、AMPK信号通路、胰高血糖素信号通路、糖尿病并发症中的AGE-RAGE信号通路、甲状腺激素信号通路、流体剪应力与动脉粥样硬化、HIF-1信号通路、丙型肝炎、胰岛素信号通路等。其中显著性最高的PPAR信号通路可参与调控肝组织的脂肪氧化,降低TG含量,维持脂质水平的稳态^[14]。这也为进一步通过体外实验验证LPAI治疗HLP的作用机制指明了方向。

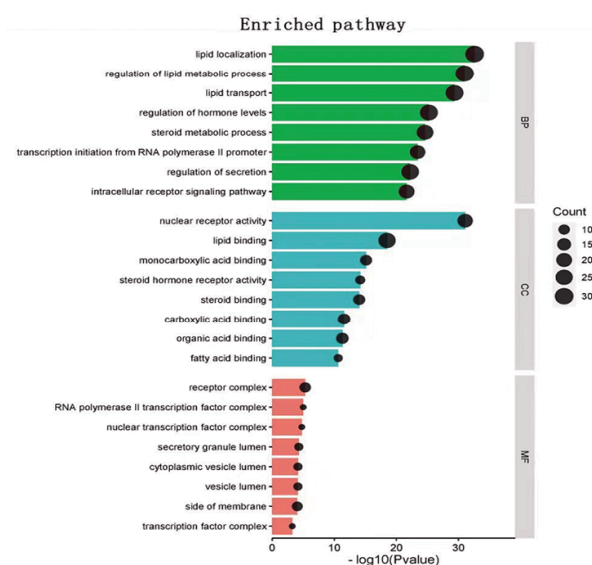


图5 LPAI治疗HLP的GO分析(排名前8)

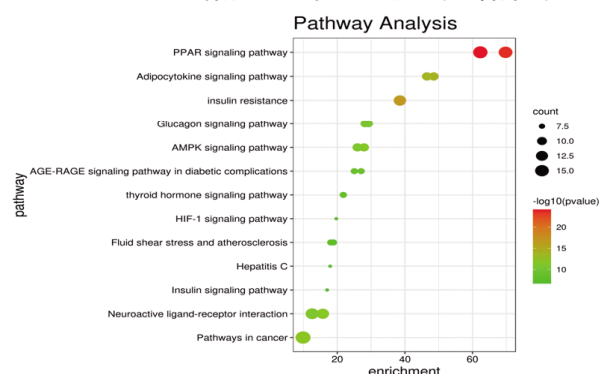


图6 LPAI治疗HLP的KEGG分析

2.6 体外实验验证

2.6.1 LPAI对L-02细胞增殖的抑制作用 LPAI(125、250、500、1 000、2 000、4 000 $\mu\text{g/mL}$)干预脂肪变性L-02细胞24、48、72 h后,随着LPAI浓度的提升及给药时间的延长,其相应的增殖抑制率逐渐升高。(见图7)这说明LPAI对FFA诱导的L-02细胞的增殖抑制作用呈浓度和时间依赖性。

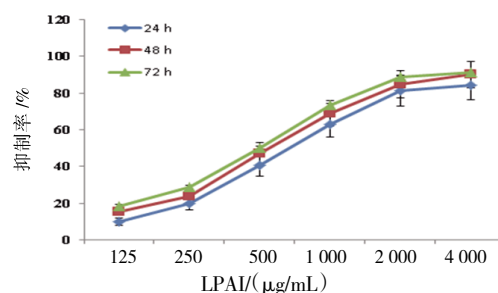


图7 LPAI对FFA诱导的L-02细胞的增殖抑制率($\bar{x} \pm s, n=5$)

2.6.2 LPAI对L-02细胞内脂滴积累的抑制作用 油红O染色结果显示,对照组L-02细胞核大而肥,核内染色质丰富,未见明显脂滴。模型组细胞核小畸形,细胞间隔微增大,胞浆内颗粒状脂质被染成橙红色,并清晰可见大小不等,数目不一致的均质性脂滴满盈抱团,这提示细胞脂肪变性模型建立成功。与模型组比较,LPAI低、中、高剂量组细胞胞浆内脂滴含量均有不同程度减少,且LPAI高剂量组细胞浆内脂滴减少程度接近于对照组。这表明LPAI能够通过降低细胞胞浆内脂滴累积,抑制细胞脂肪变性。(见图8)

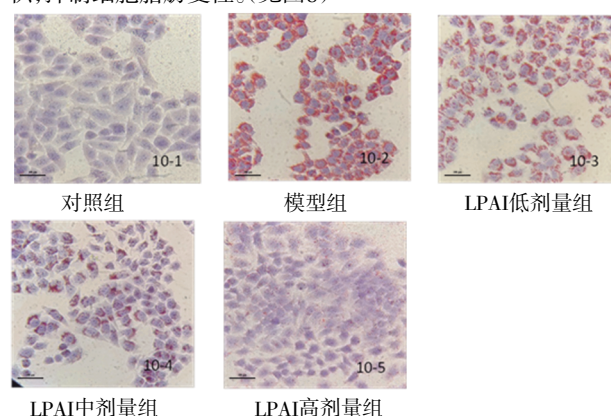
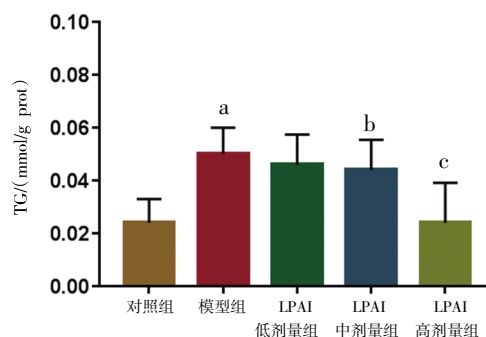


图8 LPAI对L-02细胞内脂滴的影响($\times 200$,标尺=100 μm)

2.6.3 LPAI对L-02细胞上清液中TG水平的影响 模型组TG含量高于对照组($P<0.01$);LPAI中、高剂量组TG含量低于模型组($P<0.05$ 或 $P<0.01$),说明LPAI可显著降低L02细胞内TG含量,可能为柳蒿芽降血脂的关键活性部位。(见图9)



注:与对照组比较,^a $P<0.01$;与模型组比较,^b $P<0.05$,^c $P<0.01$ 。

图9 LPAI对L-02细胞上清液TG含量的影响($\bar{x} \pm s, n=5$)

2.6.4 LPAI对L-02细胞上清液中PPAR α 和LPL蛋白表达的影响 模型组L-02细胞中PPAR α 和LPL蛋白相对表达量低于对

照组 ($P<0.01$ 或 $P<0.05$); LPAI 低、中、高剂量组细胞中 LPL 蛋白相对表达量高于模型组 ($P<0.05$); LPAI 中剂量组细胞中 PPAR α 蛋白相对表达量高于模型组 ($P<0.05$); LPAI 低、高剂量组细胞中 PPAR α 蛋白相对表达量与模型组比较, 差异无统计学意义 ($P>0.05$)。这说明 LPAI 可抑制 FFA 诱导的 L-02 细胞中 PPAR α 和 LPL 的表达。(见图 10~11)

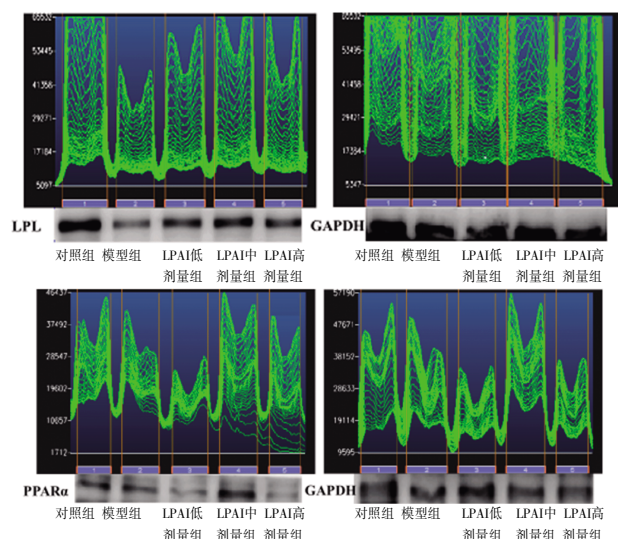
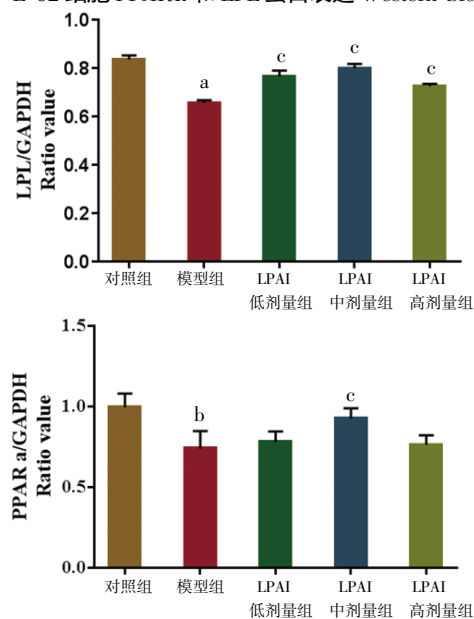


图 10 L-02 细胞 PPAR α 和 LPL 蛋白表达 Western blotting 图



注: 与对照组比较, ^a $P<0.01$, ^b $P<0.05$; 与模型组比较, ^c $P<0.05$ 。

图 11 各组 L-02 细胞 PPAR α 和 LPL 蛋白相对表达量比较 ($\bar{x}\pm s, n=5$)

3 讨 论

HLP 是指由各种原因导致的血脂水平过高, 为临床常见病^[15-17]。HLP 在蒙医临床中归属于“通拉嘎未消病”范畴。“通拉嘎未消病”的主要病因是食入过多油腻、高蛋白、高能量食物, 消化不良, 汗后受寒和运动减少导致体内巴达干黏液增多, 精华与糟粕分解衰退, 血液中脂肪成分增多。蒙古族主要以“红食(肉食)”和“白食(奶制品)”为主食, 每天摄入大量高脂肪、高蛋白、高能量食物。“通拉嘎未消病”发病率较高, 尤

其是高寒地区发病率更高。柳蒿芽对 HLP 有特殊的防治功效。课题组在前期研究^[9]中发现柳蒿芽脂溶性部位能降低 HLP 大鼠模型血脂, 但其具体作用机制尚不明确。

本研究发现柳蒿芽脂溶性部位的核心活性成分(靶点相互作用大于 28)共 5 个, 分别为油酸、亚油酸、亚麻酸、12,13-环氧亚麻酸和棕榈酸, 其中亚麻酸具有降低血清总胆固醇、甘油三酯、低密度脂蛋白、极低密度脂蛋白以及升高血清高密度脂蛋白的作用。韦恩图获得 84 个柳蒿芽脂溶性部位治疗 HLP 的潜在靶点, 这说明柳蒿芽脂溶性部位可通过多个靶点发挥抗高脂血症作用。化学成分-靶点网络中的核心靶点包括 AKT1、IL-6、TNF、VEGF、PPAR α 、LDLR, 其中 PPAR α 与脂代谢密切相关, 是重要作用靶点之一^[18-22]。PPAR α 主要在肝脏表达, 包括 L-02 细胞在内的多种细胞均可产生 PPAR α ^[23-25]。研究^[26]表明, 小鼠经 PPAR α 激动剂刺激后肝脏中脂蛋白脂酶(lipoprotein lipase, LPL)表达增加, 甘油三酯显著降低。GO 功能富集中细胞组分主要包括受体复合物、RNA 聚合酶 II 转录因子复合物和细胞膜; 分子功能主要包括脂质结合、核受体活性、转录因子结合; 生物过程主要涉及脂质定位、转运和代谢过程的调节以及胆固醇代谢。柳蒿芽脂溶性部位可通过上述途径完成细胞信号传递及能量代谢过程。KEGG 通路分析发现, 脂肪细胞因子信号通路、PPAR 信号通路和糖尿病并发症中的 AGE-RAGE 信号通路传导异常在 HLP 病理进程中具有关键的影响。

本研究在网络药理学预测的基础上, 采用 FFA 诱导 L-02 细胞脂肪变性模型, 研究柳蒿芽脂溶性部位的降血脂作用机制。柳蒿芽脂溶性部位可抑制 FFA 诱导的 L-02 细胞脂肪变性, 并与剂量和时间相关。油红 O 染色显示, 柳蒿芽脂溶性部位干预后细胞内脂滴分布在细胞膜边缘, 累积数量逐渐减少, 同时柳蒿芽脂溶性部位能显著降低 L-02 细胞上清液 TC 含量。LPL 主要在脂肪组织、心肌及骨骼肌等外周组织中表达。LPL 活性下降或功能缺失均可导致血液乳糜微粒(CM)和 VLDL 的难降解, 引起 TC、TG 和 LDL-C 浓度升高^[27]。柳蒿芽脂溶性部位可通过上调脂肪变性模型 L-02 细胞的 PPAR α 表达水平, 提高细胞内 LPL 的活性。

综上所述, 柳蒿芽脂溶性部位可调节多条生物通路共同作用抑制 HLP 的发展, 其中抑制 L-02 细胞增殖、降低细胞内 TC 含量可能与 PPAR α 表达上调有关。

参考文献

- [1] 李成消, 冷建春. 高脂血症的研究进展[J]. 临床医学进展, 2024, 14(1): 1635-1646.
- [2] 托力木吉·孟克其格, 吴斌, 赵明芬. 中医药诊治高脂血症的研究进展[J]. 新疆中医药, 2023, 41(5): 134-137.
- [3] LI W H, WANG D X, SONG G H, et al. The effect of combination therapy of allicin and fenofibrate on high fat diet-induced vascular endothelium dysfunction and liver damage in rats[J]. Lipids Health Dis, 2010, 9: 131.
- [4] 吴茂兰, 翁家俊, 崔黎, 等. 基于肠道菌群的中药防治高脂血症及降低其相关危险因素的研究进展[J]. 中成药, 2023,

- 45(8):2642–2650.
- [5] 王鑫玉,赵一慕,高云,等.普洱茶素Ⅱ改善高脂血症ApoE^{-/-}小鼠动脉粥样硬化作用机制研究[J].中草药,2023,54(4):1157–1163.
- [6] 朱发伟,叶合,楼招欢,等.荷叶调节水通道蛋白拮抗高脂血症的作用机制研究[J].上海中医药杂志,2023,57(2):66–71.
- [7] 托亚,金晓红.达翰尔人喜食-柳蒿芽[J].中国民间疗法,2007,8(15):10–11.
- [8] 韩丽鑫.民间食用野菜的药物功效[J].医学信息(中旬刊),2011(8):4204.
- [9] 王青虎,敖苏日古嘎,包文林,等.柳蒿脂溶性部位对高脂血症大鼠脂质代谢及肝脏的影响[J].中草药,2022,53(11):3402–3409.
- [10] 徐艳华.柳蒿脂溶性成分对高脂血症大鼠脂代谢及相关基因和蛋白质表达的影响[D].通辽:内蒙古民族大学,2020.
- [11] 王青虎,额尔敦布拉嘎,徐艳华,等.柳蒿芽化学成分研究[J].中国药学杂志,2018,53(20):1726–1728.
- [12] WANG Q H, XU Y H, BAO W Q, et al. Structure elucidation and antimicrobial activities of five compounds from *Artemisia integrifolia* L[J]. Z Naturforsch C J Biosci, 2019,74(9–10):275–278.
- [13] BORCHULUUN S, WANG Q H, XU Y H, et al. Structure elucidation and NMR assignments of a new sesquiterpene of volatile oil from *Artemisia frigida* Willd[J]. Nat Prod Res, 2021,35(14):2376–2380.
- [14] 吴一冰,周小青,颜冬梅,等.中药激活PPAR α 通路治疗高脂血症的活性成分及作用机制研究进展[J].中国实验方剂学杂志,2023,29(11):247–254.
- [15] 董阳,李敬华,王家明.中医治疗高脂血症临床研究进展[J].中国中医药图书情报杂志,2023,47(4):170–173.
- [16] 罗烨,鲍冠君.高脂血症发生的影响因素研究进展[J].临床医学进展,2024,14(3):2196–2201.
- [17] 侯红平,王彩霞,彭博,等.臻通集胶囊对高脂血症模型大鼠的治疗作用及其机制研究[J].中医导报,2022,28(9):14–18,24.
- [18] 段钰卉,代泓钰,安永铖,等.基于PPAR- α /CPT-1信号通路的桑叶总黄酮调控T2DM大鼠肝脏脂质代谢作用及其机制[J].中国实验方剂学杂志,2022,28(15):61–69.
- [19] 欧阳银,陈博威,刘英飞,等.补阳还五汤通过cAMP/PKA/PPAR γ 通路调控脂质代谢抗大鼠脑缺血再灌注损伤的作用[J].中药新药与临床药理,2024,35(5):667–673.
- [20] 黄萍,周祯祥,李德顺,等.基于代谢组学和网络药理学探讨细辛-干姜药对对COPD大鼠肺、肝脂质代谢的影响[J].中国实验方剂学杂志,2022,28(18):152–160.
- [21] 陈星澎,张帆,裴冬梅.连翘苷通过PPARs信号通路对肥胖大鼠脂质代谢与肠道菌群失调的改善作用研究[J].中药材,2022,45(4):942–947.
- [22] 张雷,彭惠平,朱萍.降脂脉安方对非酒精性脂肪性肝病大鼠脂质代谢和炎症反应的影响[J].中医导报,2024,30(4):13–18.
- [23] 龚顺航,杨杰,张金涛,等.基于HMGCR及PPAR α 信号通路探究雪莲果浸膏对高脂血症大鼠脂质代谢的影响[J].南方医科大学学报,2023,43(11):1977–1983.
- [24] 王资隆,饶慧瑛.PPAR α 激动剂治疗非酒精性脂肪性肝病的研究进展[J].肝脏,2023,28(4):396–398.
- [25] 行情文,吴华,刘嘉华,等.低氧环境紫锥菊提取物-菊苣酸通过PPAR信号通路对SD大鼠肝脏组织脂肪合成的影响[J].中国兽医学报,2024,44(1):135–140.
- [26] MINNICH A, TIAN N, BYAN L, et al. A potent PPAR α agonist stimulates mitochondrial fatty acid β -oxidation in liver and skeletal muscle[J]. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2001,280(2):e270–e279.
- [27] KONG W J, ZHANG H, SONG D Q, et al. Berberine reduces insulin resistance through protein kinase C-dependent up-regulation of insulin receptor expression[J]. Metabolism, 2009,58(1):109–119.

(收稿日期:2024-06-19 编辑:蒋凯彪)

(上接第7页) [M]. Cambridge: Cambridge University Press, 1982.

- [11] MARTIN J R, WHITE P R. The language of evaluation[M]. Basingstoke: Palgrave Macmillan, 2003.
- [12] MARTIN J, WHITE P R. The language of evaluation: Appraisal in English[M]. Berlin: Springer, 2007:42–56.
- [13] 付杰.积极话语分析视角下《人类减贫的中国实践》白皮书的评价资源研究[D].沈阳:辽宁大学,2023.
- [14] 徐万治,武敏敏,李晓晴.基于评价理论“态度系统”的能源话语之积极话语分析:以《第十一届国际石油技术大会专题报道》为例[J].中国石油大学学报(社会科学版), 2021,37(2):28–34
- [15] 张伟.浅谈全球三大企业排行榜的评选标准[J].晋阳学

刊,2005(1):125–127.

- [16] 王缉思,赵建伟.评美国亚太“再平衡”战略[J].冷战国际史研究,2017(1):55–90.
- [17] 国家中医药管理局.中医医院中医药文化建设指南[N].中国中医药报,2009-08-10(002).
- [18] 傅文第.中医药文化传播的现实困境与对策选择[J].中国医药导报,2018,15(31):119–123.
- [19] 王凯,于朝晖.跨越文化边界助力企业出海[J].中国商人, 2024(2):196–197.
- [20] 徐豪,刘嵘,赵溪,等.2019年中国企业海外形象高峰论坛在北京举行 在更高水平开放中推进中国企业海外形象建设[J].中国报道,2019(12):46–49.

(收稿日期:2024-06-25 编辑:李海洋)