

丹荷颗粒对混合型高脂血症大鼠氧化应激的调控作用

孟敬轲^{1,2}, 刘素素^{1,2}, 高攀^{1,2}, 贾明娇^{1,2}, 贾博超^{1,2}, 邢庆正^{1,2},
陈玉龙^{1,2}, 王伟^{1,2,3*}, 柴欣楼^{1,2*}

(1. 北京中医药大学 中医学学院, 北京 100029; 2. 北京中医药大学 证候与方剂基础研究教育部
重点实验室, 北京 100029; 3. 广州中医药大学 中药学院, 广州 510006)

[摘要] **目的:**基于网络药理学、动物和细胞实验探讨丹荷颗粒治疗混合型高脂血症的机制。**方法:**利用中药系统药理学数据库与分析平台(TCMSP)、传统中药百科全书(ETCM)等数据库筛选丹荷颗粒活性成分及靶点,通过基因卡数据库(GeneCard)获取混合型高脂血症相关靶点,取交集后进行基因本体论功能注释(GO)及京都基因与基因组百科全书通路富集分析(KEGG);采用棕榈酸(PA)诱导人肝癌细胞(HepG2)建立高脂模型,给予丹荷颗粒干预,检测细胞内脂质含量、氧化应激水平;建立混合型高脂血症大鼠模型,设丹荷颗粒低、中、高剂量组(1.134、2.268、4.536 g·kg⁻¹)及阳性药普伐他汀钠组(4.020 mg·kg⁻¹),干预8周后检测血清脂质水平、炎症因子、氧化应激及肝组织脂质代谢关键蛋白表达。**结果:**网络药理学筛选出丹荷颗粒与混合型高脂血症交集靶点93个,过氧化物酶体增生激活受体 γ (PPARG)、过氧化物酶体增植物激活受体 α (PPARA)、肿瘤坏死因子(TNF)、白细胞介素(IL)-6、IL-1B等靶点位居前列,PPARA信号通路、晚期糖基化终产物-晚期糖基化终产物受体(AGE/RAGE)信号通路、脂质代谢与动脉粥样硬化及非酒精性脂肪性肝病富集通路位居前列。细胞实验表明,丹荷颗粒可显著降低活性氧(ROS)、丙二醛(MDA)水平,升高过氧化氢酶(CAT)水平($P<0.05$),减少HepG2细胞内脂质积累和甘油三酯(TG)含量。动物实验显示,丹荷颗粒能显著降低混合型高脂血症大鼠总胆固醇(TC)、TG和低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)水平($P<0.05$),降低MDA水平,升高超氧化物歧化酶(SOD)、CAT水平。减轻肝脏脂肪变性,上调肝脏过氧化物酶体增植物启动受体 α (PPAR α)和脂蛋白脂肪酶(LPL)的表达,下调固醇调节元件结合蛋白1(SREBP1)的表达($P<0.05$, $P<0.01$)。**结论:**丹荷颗粒可以通过降低MDA,升高SOD、CAT的水平,消除过量的ROS,抑制氧化应激,并减轻肝损伤,同时上调PPAR α 、LPL表达水平,抑制SREBP1表达水平,改善脂质代谢紊乱。

[关键词] 丹荷颗粒; 混合型高脂血症; 氧化应激; 脂质代谢

[中图分类号] R289;R259;R285 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2026)10-0112-11

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20252505

[网络出版地址] <https://link.cnki.net/urlid/11.3495.r.20251229.0920.003>

[网络出版日期] 2025-12-29 15:51:51 **[增强出版附件]** 内容详见 <http://www.syfjxzz.com> 或 <http://cnki.net>



Regulatory Effect of Danhe Granules on Oxidative Stress in Rats with Mixed Hyperlipidemia

MENG Jingke^{1,2}, LIU Susu^{1,2}, GAO Pan^{1,2}, JIA Mingjiao^{1,2}, JIA Bochao^{1,2}, XING Qingzheng^{1,2},
CHEN Yulong^{1,2}, WANG Wei^{1,2,3*}, CHAI Xinlou^{1,2*}

(1. School of Traditional Chinese Medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China; 2. Key Laboratory of TCM Syndromes and Formula, Ministry of Education, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China; 3. School of Chinese Materia Medica, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the therapeutic mechanism of Danhe granules in treating mixed hyperlipidemia based on network pharmacology, as well as animal and cell experiments. **Methods:** The active compounds and targets of Danhe granules

[收稿日期] 2025-10-22

[基金项目] 国家“重大新药创制”科技重大专项(2019ZX09201004-001-021)

[第一作者] 孟敬轲, 硕士, 从事中医药防治心血管疾病的研究, E-mail: 20230931122@bucm.edu.cn

[通信作者] * 王伟, 博士, 教授, 从事中西医结合防治心血管疾病的基础研究, E-mail: wangwei@bucm.edu.cn;

* 柴欣楼, 博士, 教授, 从事中医药防治心血管疾病的研究, E-mail: mmxin3@126.com

were screened using the Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology Database and Analysis Platform (TCMSP) and the Encyclopedia of Traditional Chinese Medicine (ETCM). Related targets for mixed hyperlipidemia were obtained from the GeneCards database. The intersecting targets were subjected to Gene Ontology (GO) functional annotation and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway enrichment analyses. A high-fat model was established in human hepatocellular carcinoma cells (HepG2) induced by palmitic acid (PA), followed by intervention with Danhe granules to assess intracellular lipid accumulation and oxidative stress levels. A mixed hyperlipidemia rat model was also established and divided into low-, medium-, and high-dose Danhe granules groups (1.134, 2.268, and 4.536 g·kg⁻¹, respectively), as well as a positive control group treated with pravastatin sodium (4.020 mg·kg⁻¹). After eight weeks of intervention, serum lipid levels, inflammatory factors, oxidative stress indices, and the expression of key hepatic lipid metabolism-related proteins were determined. **Results:** Network pharmacology identified 93 intersecting targets between Danhe granules and mixed hyperlipidemia, with peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARG), peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARA), tumor necrosis factor (TNF), interleukin-6 (IL-6), and IL-1B among the key nodes. The PPAR signaling pathway, AGE/RAGE signaling pathway, lipid metabolism, atherosclerosis and non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) were among the most significantly enriched pathways. Cellular experiments demonstrated that Danhe granules significantly reduced reactive oxygen species (ROS) and malondialdehyde (MDA) levels while increasing catalase (CAT) activity ($P<0.05$), thereby alleviating intracellular lipid accumulation and triglyceride (TG) content in HepG2. In animal experiments, Danhe granules markedly decreased serum total cholesterol (TC), TG, and low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C) levels ($P<0.05$), reduced hepatic MDA levels, and elevated superoxide dismutase (SOD) and CAT levels. Histological analysis showed alleviation of hepatic steatosis, upregulation of hepatic PPARA and lipoprotein lipase (LPL) expressions, and downregulation of sterol regulatory element-binding protein 1 (SREBP1) expression ($P<0.05$, $P<0.01$). **Conclusion:** Danhe granules improve lipid metabolism disorders in mixed hyperlipidemia by reducing MDA levels, enhancing SOD and CAT activities, scavenging excessive ROS, inhibiting oxidative stress, and mitigating liver injury. The underlying mechanism may involve the upregulation of PPARA and LPL and the suppression of SREBP1 expression.

[Keywords] Danhe granules; mixed hyperlipidemia; oxidative stress; lipid metabolism

混合型高脂血症是一种以血清总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)和低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)水平同时升高为特征的脂质代谢紊乱性疾病。在中国, LDL-C未达标的患者中约有33.4%伴有高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)降低和TG升高,老年群体中的患病率尤为突出^[1-2]。混合型高脂血症中多种血脂成分的持续异常可显著增加心血管疾病的发生风险^[3-4],特别是小而致密的低密度脂蛋白颗粒,会导致活性氧(ROS)的产生,从而产生氧化应激,这种氧化应激在动脉粥样硬化和其他心血管并发症的发展中至关重要。

目前临床虽已有多种可降低TC、TG和LDL-C的药物,但单一药物治疗方案因作用靶点局限,往往对混合型高脂血症的效果不甚理想。而且现有治疗手段在抑制氧化应激方面作用有限,无法从根本上阻断脂质过氧化与血管内皮损伤的恶性循环,从而难以有效控制心血管风险。近年来,在LDL-C达标基础上,进一步降低TG和TC可使更多患者的心血管疾患得到改善^[5]。然而联合用药虽可增强降脂疗效,但伴随药疹、肌溶解及严重的肝功能损害,限制其长期应用^[6]。因此,开发兼具降脂与抗氧化双重功效的安全、高效治疗策略成为当务之急。

中医药在多成分、多靶点、整体调节方面具有独特优势,且安全性良好,为降脂药物的研发提供

了新方向。丹荷颗粒来源于名老中医郭维琴经验方丹荷汤^[7],由丹参、陈皮、薏苡仁、虎杖、山楂、荷叶组成(比例为2:2:2:2:6:3),丹参为君药,入心肝经,活血祛瘀;陈皮、薏苡仁为臣药,健脾化痰;虎杖、山楂为佐药,活血消积;荷叶为使药,清热利湿、升清降浊。诸药相须为用,共奏活血健脾、化痰降浊之效。前期研究表明丹荷颗粒在治疗单纯性高脂血症方面具有良好的效果^[8-9],可显著降低TC、TG及LDL-C水平,同时,对氧化应激有较强的抑制作用,然而,丹荷颗粒调节脂代谢和抗氧化损伤的具体机制尚未完全明确。基于此,本研究拟采用网络药理学分析方法,并通过建立棕榈酸(PA)诱导的人肝癌细胞(HepG2)模型验证抗氧化作用及混合型高脂血症大鼠评价丹荷颗粒的降脂与抗氧化效果。

1 材料

1.1 动物与细胞 8周龄SPF级雄性SD大鼠,体重180~200 g,由斯贝福(北京)生物技术有限公司提供,实验动物生产合格证号SCXK(京)2019-0010。动物饲养于同仁堂研究院SPF级屏障环境[(每日给予标准饲养和正常光照,温度(22±1)℃,湿度(55±5)%,在适应性饲养后开始实验)]。人肝癌细胞(HepG2),购于百诺威公司,来源于北京协和细胞库(批号20230612)。

1.2 伦理 实验方案经同仁堂研究院实验动物伦

理委员会审批(伦理批号 YJY-2021-040201),所有操作严格遵循 ARRIVE 指南及动物实验 3R 原则。

1.3 高脂饲料 在基础维持饲料中加入 20.0% 蔗糖、15% 猪油、1.2% 胆固醇和 0.2% 胆酸钠,并补充酪蛋白、磷酸氢钙与石粉等。除粗脂肪外,水分、粗蛋白、粗纤维、粗灰分、钙、磷及钙磷比等指标均符合国家维持饲料标准。

1.4 药物与试剂 普伐他汀钠片[第一三共制药(上海)有限公司,批号 SX059MC,10 mg/片];血脂康胶囊(北京北大维信生物科技有限公司,批号 20200923,规格 0.3 g/粒);丹荷颗粒(北京中医药大学中医研究院提供批号 D2005007,经清华大学药学院技术中心鉴定其主要成分包括丹酚酸 E、荷叶碱、川陈皮素等);丙二醛(MDA)测定试剂盒、超氧化物歧化酶(SOD)测定试剂盒、过氧化氢酶(CAT)测定试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号分别为 A003-1-2、A001-3-2、A007-1-1);TC 检测试剂盒、甘油三酯(TG)检测试剂盒、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)检测试剂盒、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)检测试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号分别为 A111-1-1、A110-1-1、A112-1-1、A113-1-1);脂蛋白脂肪酶(LPL)、固醇调节元件结合蛋白 1(SREBP1)抗体(英国 Abcam 公司,批号分别为 ab21356、ab28481);过氧化物酶体增殖物启动受体 α (PPAR α)抗体(美国 Proteintech 公司,批号 66826-1-Ig); β -肌动蛋白(β -actin)抗体(上海爱必信生物科技有限公司,批号 AB2001);总 RNA 提取试剂(上海美基生物科技有限公司,批号 R4801-01);HiScript[®] III All-in-one RT Super Mix(南京诺唯赞生物科技股份有限公司,批号 R333);MEM 培养基(武汉普诺赛生命科技有限公司,批号 PM150410);优级胎牛血清(北京翱擎生物科技有限公司,批号 mv06600);棕榈酸(美国 Sigma 公司,批号 76119-5G);苏木素-伊红(HE)试剂盒(武汉赛维尔生物科技有限公司,批号 G1076);油红 O 试剂盒(北京索莱宝科技有限公司,批号 G1262)。

1.5 仪器 SpectraMax i3 型酶标仪[美谷分子仪器(上海)有限公司];BSA224S 型电子分析天平[赛多利斯科学仪器(北京)有限公司];5424R 型低温高速离心机[艾本德(上海)贸易有限公司];TBA-120 型全自动生化分析仪(日本东芝公司);MV-100 型漩涡振荡器(武汉赛维尔生物科技有限公司);EG1150 型石蜡包埋机、Aperio CS2 型数字切片扫描仪(德国 Leica 公司);LT-CPS38C 型高压蒸汽灭菌锅(上海力

申科学仪器有限公司);SCIENTZ-48 型高通量组织研磨器(宁波新芝生物科技股份有限公司);Mini P-4 型小型垂直电泳系统、CFX Connect 1855201 型实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)仪(美国 Bio-Rad 公司);5200 型全自动化学发光图像分析系统(上海天能科技有限公司);SMP-2 型微孔板离心机、G6065 型 Real-time PCR 封板膜(武汉赛维尔生物科技有限公司);ETC811 型 PCR 仪(北京东胜创新生物科技有限公司);SW-CJ-1FD 型超净工作台(苏州安泰空气技术有限公司)。

2 方法

2.1 网络药理学

2.1.1 药代动力学信息收集 利用中药系统药理学数据库与分析平台(TCMSP, <http://tcmssp.com/tcmssp.php>)、传统中药百科全书(ETCM, <http://www.tcmip.cn/ETCM/>)、本草组鉴(HERB, <http://herb.ac.cn/v2>)等检索丹荷颗粒的药理学活性成分及其药代动力学参数。

2.1.2 混合型高脂血症相关靶点预测 通过基因卡数据库(GeneCards, <http://www.genecards.org/>)检索与混合型高脂血症(关键词:“mixed hyperlipidemia/hyperlipidemia”)相关靶点。筛选标准为候选靶点与混合型高脂血症具有明确关联性。

2.1.3 蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)网络构建 整合丹荷颗粒潜在作用靶点与混合型高脂血症相关靶点,利用 Venny 2.1 在线工具(<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>)获取交集靶点。将交集靶点导入 STRING 11.0 数据库(<https://string-db.org/>),设定物种为“Homo sapiens”,构建药物-疾病靶点 PPI 网络。使用 Cytoscape 3.10.0 软件进行网络可视化,并以节点度值高于平均值作为筛选关键靶点的标准。

2.1.4 基因功能与通路富集分析 通过微生信平台(<https://www.bioinformatics.com.cn/>)对筛选得到的交集靶点进行基因本体(GO)功能注释及京都基因与基因组百科全书通路富集分析(KEGG)通路富集分析,并可视化展示 KEGG 富集分析中显著性排名前 10 的通路。

2.1.5 分子对接 在公共化学数据库(PubChem)查询关键成分 3D 结构文件,经化学 3D(Chem3D)、自动对接工具(AutoDockTools)进行能量最小化等预处理;在蛋白质数据库(PDB)获取核心靶点蛋白结构,应用 PyMOL、AutoDockTools 去除水分子、加氢等预处理;基于 AutoDock Vina 对关键成分与核心

靶点进行分子对接,并用PyMOL可视化。

2.2 细胞培养和治疗 将HepG2细胞置于含10%胎牛血清(FBS)与1%青霉素/链霉素(P/S)的高糖杜尔贝科改良伊格尔(DMEM)培养基,在37℃、5%CO₂加湿条件下培养。通过棕榈酸(PA)诱导建立肝细胞内脂质积累模型。同时,将不同剂量的丹荷颗粒(DHG, 0.025、0.05、0.1、0.2、0.4、0.8 g·L⁻¹)加入培养基中,观察其对脂质积累的影响。

肝细胞内脂质积累模型采用棕榈酸(PA)诱导建立^[10]。PA的处理浓度范围综合参考了课题组前期预实验结果及相关文献报道。研究表明,300 μmol·L⁻¹ PA可有效诱导HepG2细胞发生脂毒性反应,伴随氧化应激增强及线粒体功能障碍^[11]。因此,为更精确描绘PA的剂量效应关系并确定其半数抑制浓度(IC₅₀),本研究在0~400 μmol·L⁻¹范围内设置不同浓度梯度(50、100、150、200、250、300、350、400 μmol·L⁻¹),将HepG2细胞在37℃、5%CO₂下孵育24 h。随后于450 nm波长下使用酶标仪测定细胞活力,并通过细胞增殖与活性检测试剂盒(CCK-8)法计算相对存活率。IC₅₀值采用GraphPad Prism 9.0软件进行非线性回归分析计算,拟合模型选择四参数逻辑方程,由软件自动生成最佳拟合曲线及对应IC₅₀值。通过试剂盒检测HepG2细胞的TC水平;通过蛋白免疫印迹法(Western blot)检测细胞中的脂代谢指标;通过试剂盒检测细胞氧化应激相关指标:ROS、CAT、MDA的表达量。

2.3 动物造模及分组 SPF级SD大鼠先进行1周适应性饲养后,随机分为空白组(Control)和模型组。造模组饲喂高脂饲料,2周后确认造模成功(成功率100%)。依据血清TC水平,将造模大鼠随机分为以下6组(n=6/组):模型组(Model组)、丹荷颗粒低剂量组(DHG-L, 1.134 g·kg⁻¹)、丹荷颗粒中剂量组(DHG-M, 2.268 g·kg⁻¹)、丹荷颗粒高剂量组(DHG-H, 4.536 g·kg⁻¹)、普伐他汀钠组(4.020 mg·kg⁻¹)、血脂康组(0.12 g·kg⁻¹)。给药剂量依据人与大鼠体表面积等效剂量换算确定^[12], DHG-L、DHG-M、DHG-H组剂量分别相当于临床等效剂量的0.5、1、2倍。Control组与Model组灌胃等体积生理盐水(10 mL·kg⁻¹)。所有给药均每日定时进行。

2.4 病理学检查 大鼠处死后立即取出肝脏,用生理盐水冲洗干净,部分组织置于4%多聚甲醛中固定。固定后,肝组织经梯度乙醇脱水、石蜡包埋,并切片(厚度5 μm)。切片先经二甲苯脱蜡、梯度乙醇

复水,再行苏木素染色(3~5 min)、1%盐酸分化(10 s)、HE染色(5 min),随后脱水透明并用中性树脂封固。使用光学显微镜观察并拍摄肝组织病理图像。

2.5 肝指数测定 大鼠处死后迅速剖取肝脏,生理盐水洗净,滤纸吸干表面液体后称质量。按以下公式计算肝指数:肝指数=[肝质量(g)/体质量(g)]×100%。

2.6 血脂四项检测 末次给药后,大鼠禁食12 h(自由饮水),腹腔注射2%戊巴比妥钠(0.2 mL·kg⁻¹)麻醉。腹主动脉取血,室温静置1 h后,3 000 r·min⁻¹离心15 min分离血清(离心半径15 cm),-20℃保存。使用相应试剂盒检测血清TC、TG、LDL-C、HDL-C水平,并计算HDL-C/TC值以评估冠状动脉疾病风险。

2.7 肝组织TC、TG水平检测 取-80℃冻存肝组织约40 mg,置于冰上。加入无水乙醇制备10%(W·V⁻¹)肝组织匀浆,2 500 r·min⁻¹离心10 min(4℃),收集上清液。参照试剂盒说明书检测肝组织TC和TG含量。

2.8 肝脏氧化应激指标检测 同2.7项称取保存在-80℃肝脏样本,按照试剂盒的说明进行MDA、SOD、CAT检测。

2.9 Western blot检测LPL、SREBP1、PPARα蛋白表达 取冻存肝组织约40 mg,加入含蛋白酶/磷酸酶抑制剂的RIPA裂解液,经组织匀浆机(55 Hz, 10 min)研磨,冰浴30 min后,12 000 r·min⁻¹ 4℃离心,10 min取上清(离心半径7 cm)。采用聚丙烯酰胺正丁酯(BCA)法测定蛋白浓度并调整浓度。蛋白样品加入5×Loading Buffer,95℃金属浴变性10 min。配制8%或10%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)凝胶进行电泳(100 V,约70 min)。随后将蛋白电转至预活化的PVDF膜(100 V,90 min,冰浴)。转膜后,膜用5%脱脂牛奶室温封闭60 min;TBST洗涤后,分别与一抗(LPL 1:500, SREBP1 1:1 000, PPARα 1:1 000)4℃孵育过夜;TBST洗涤后,与相应HRP标记二抗(兔抗1:10 000,鼠抗1:10 000)室温孵育60 min;TBST充分洗涤后,滴加ECL发光液显影曝光。得到的胶片图像使用Image J软件进行分析,测定目的条带灰度值,并将其与内参条带灰度值的比值作为目的蛋白的相对表达量,随后对数据进行归一化处理。

2.10 Real-time PCR检测混合型高脂血症大鼠SREBP1、LPL mRNA的表达 取冻存肝组织约

25 mg,使用试剂盒提取总RNA,并通过纳米微量分光光度计(NanoDrop)测定浓度及纯度($A_{260}/A_{280} \approx 1.8 \sim 2.1$)。使用HiScript III All-in-one RT SuperMix进行逆转录合成cDNA(50 °C 15 min, 85 °C 5 s)。采用NovoStart SYBR Real-time PCR SuperMix Plus进行Real-time PCR, 20 μ L反应体系包含: 2 \times SuperMix 10 μ L, 上、下游引物(SREBP1, 上游5'-CGCTACCGTTCCTCTATCAATGAC-3', 下游5'-AGTTTCTGGTTGCTGTGCTGTAAG-3', 扩增长度236 bp; LPL, 上游5'-CGCTCCATCCATC TCTTCATTGAC-3', 下游5'-CCCTTTCTCAAAT GCCTCCTTGG-3', 扩增长度172 bp; GAPDH, 上游5'-AAGTTCAACGGCACAGTCAAGG-3', 下游5'-GACATACTCAGCACCAGCATCAC-3', 扩增长度118 bp)各0.4 μ L, cDNA模板2 μ L, RNase Free Water 7.2 μ L。反应程序: 95 °C预变性60 s; 95 °C 20 s, 60 °C 60 s, 共39个循环。采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法分析基因相对表达量。

2.11 统计学分析 采用GraphPad Prism 9.0软件对实验数据进行统计分析并绘图,数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,数据进行正态检验和方差齐性检验,符合正态性和方差齐则采用单因素方差分析(One-way ANOVA),若不符合正态性分布,则采用非参数检验进行评估, $P < 0.05$ 表示差异具有显著性。

3 结果

3.1 丹荷颗粒治疗混合型高脂血症网络药理学分析

3.1.1 丹荷颗粒成分及混合型高脂血症靶点的分析 以“丹参”“陈皮”“薏苡仁”“虎杖”“山楂”“荷叶”为关键词在TCMSP、Herb、Batman、ETCM等数据库,并通过文献进行补充,共确定有效成分92个,在UniProt数据库中对92个活性成分所关联的靶点进行信息标准化处理后得到成分靶点340个。通过GeneCard数据库挖掘搜索,筛选疾病Relevance score ≥ 1 的靶点810个。

3.1.2 核心靶点的确立 通过Venn图确定了93个交集靶点(见增强出版附加材料),并将其导入STRING数据库。随后,将从STRING数据库获得的93个靶点导入Cytoscape 3.10.1软件,进行PPI网络的拓扑学分析,颜色越深度值越大。通过DC ≥ 68 、BC ≥ 33.08 、CC ≥ 0.61 的筛选标准,最终确定了9个潜在治疗靶点,包括过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (PPARG)、过氧化物酶体增殖物激活受体 α (PPARA)、肿瘤坏死因子(TNF)、白细胞介素

(IL)-6、IL-1 β 、蛋白激酶B1(Akt1)等(见增强出版附加材料)。

3.1.3 “中药-成分-靶点”网络构建 将核心靶点、核心靶点涉及的活性成分导入Cytoscape3.10.1软件,得“活性成分-治疗靶点-疾病”网络,该网络涵盖了191个节点及576条关联线,见增强出版附加材料。利用插件CytoNCA计算网络中成分节点的度值,得到排名前5的成分,包括槲皮素、木犀草素、山柰酚、柚皮素和异鼠李素。见表1。

表1 丹荷颗粒排名前5的核心成分

Table 1 Top 5 core ingredients in Danhe granules

MOL	来源	关键成分(中英文)		度值
MOL000098	HZ HY SZ	Quercetin	槲皮素	59
MOL000006	DS HZ	Luteolin	木犀草素	25
MOL000422	SZ HY	Kaempferol	山柰酚	22
MOL004328	CP	Naringenin	柚皮素	20
MOL000354	SZ HY	Isorhamnetin	异鼠李素	18

3.1.4 GO与KEGG通路分析 通过GO注释分析可获得基因的各种生物学功能。将93个丹荷颗粒治疗混合型高脂血症的靶点导入微生物信平台(<https://www.bioinformatics.com.cn/>)进行GO和KEGG分析。KEGG通路富集分析得到通路256条(见增强出版附加材料),根据P值选取显著性前10的通路和相关疾病,包括晚期糖基化终产物(AGE)/晚期糖基化终产物受体(RAGE)信号通路、PPAR信号通路、IL-17信号通路、流体剪切应力与动脉粥样硬化、脂质和动脉粥样硬化、疟疾、非酒精性脂肪性肝病等。GO富集分析(见增强出版附加材料)得到了3408条生物过程(BP),包含对脂多糖的反应等;198个细胞组分(CC),包含膜筏等;396项分子功能(MF),包含核受体活性等,基于富集度选取排名前十的GO分析结果。

3.1.5 “活性成分-治疗靶点-关键通路”网络构建 应用Cytoscape3.10.1软件将3.1.3项与3.1.4项的分析结果加以整合,构建了描述“中药-活性成分-治疗靶点-关键通路”相互作用的网络(见增强出版附加材料),该网络涵盖了133个节点及317条关联线。根据3.1.2项确定的关键靶点PPARG、PPARA、TNF、IL-6、IL-1 β ,将主要成分-靶点可视化(见增强出版附加材料),筛选出槲皮素、木犀草素、山柰酚、柚皮素等关键成分,经由SwissADME平台筛选均符合胃肠吸收度。

3.1.6 核心靶点与关键成分的分子对接 因

PPARA与氧化应激关系密切,选择PPARA作为分子对接的受体,选择槲皮素、木犀草素、山柰酚、柚皮素作为配体,应用AutoDock Vina对4种组合进行分子对接运算,结果见增强出版附加材料,氢键结合能见表2。

3.2 HepG2细胞内高脂模型建立

3.2.1 PA对HepG2细胞的活性影响 与空白组比较,当PA浓度为50、100、150、200、250、300、350、400 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,细胞增殖率显著降低,差异有统计学意义($P<0.01$),通过CCK-8数据处理得到 $\text{IC}_{50}=287.9$ (增强出版附加材料),99%置信区间为271.7至303.7。鉴于文献研究和前期预实验结果,当PA浓

表2 分子对接蛋白-成分氢键结合能

Table 2 Molecular docking protein-component hydrogen bond binding energy kcal·mol⁻¹

蛋白	成分	氢键结合能
PPARA	槲皮素	-8.3
	木犀草素	-8.0
	山柰酚	-8.1
	柚皮素	-7.2

度为300 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,细胞活力约为52%,能显著增加(60%~70%)ROS的产生^[11]。故采用300 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PA的浓度进行后续实验。见表3。

表3 不同浓度的PA对HepG2细胞活性的影响、不同浓度的丹荷颗粒对HepG2细胞活性的影响及不同浓度丹荷颗粒对PA诱导的HepG2细胞的活性的影响($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 3 Effect of different concentrations of PA on HepG2 cell viability, effect of different concentrations of Danhe granules on HepG2 cell viability, and effect of different concentrations of Danhe granules on PA-induced HepG2 cell viability ($\bar{x}\pm s, n=6$)

PA浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	细胞活性/%	DHG质量浓度/ $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	细胞活性/%	PA浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ +DHG质量浓度/ $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	细胞活性/%
0	100.00±0.00	0	100.00±0.00	0	100.00±0.00
50	88.75±4.58 ²⁾	0.025	97.45±7.07	300	58.69±14.08 ²⁾
100	83.24±3.74 ²⁾	0.05	99.25±11.77	300+0.025	78.29±12.31 ³⁾
150	83.13±5.32 ²⁾	0.1	98.83±9.58	300+0.05	77.22±9.04 ³⁾
200	80.42±4.88 ²⁾	0.2	97.60±9.31	300+0.1	85.82±13.44 ⁴⁾
250	68.51±5.50 ²⁾	0.4	97.69±9.90	300+0.2	90.41±15.63 ⁴⁾
300	52.19±2.42 ²⁾	0.8	99.47±3.85	300+0.4	109.05±17.98 ⁴⁾
350	29.85±2.84 ²⁾	1.6	75.67±5.08 ²⁾	300+0.8	78.08±13.27 ³⁾
400	14.37±1.68 ²⁾				

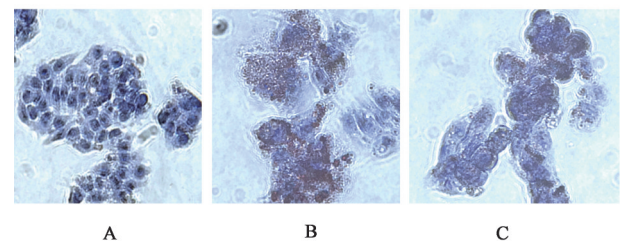
注:与PA组比较¹⁾ $P<0.05$,²⁾ $P<0.01$;与DHG组比较³⁾ $P<0.05$,⁴⁾ $P<0.01$

3.2.2 丹荷颗粒对HepG2细胞的细胞活性的影响 与空白组比较,丹荷颗粒质量浓度在0.8 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 及以下HepG2细胞活力无明显差异,而1.6 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的丹荷颗粒显著降低HepG2的活性($P<0.01$),因此可以确定丹荷颗粒浓度在0.8 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 以下是给药安全浓度范围。见表3。

3.2.3 丹荷颗粒对PA诱导的HepG2细胞的细胞活性影响 与空白组比较,PA组显著降低HepG2细胞活性($P<0.01$),与模型组比较,各浓度丹荷颗粒组显著升高HepG2细胞活性,其中以0.4 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 质量浓度的丹荷颗粒最为显著($P<0.01$),表明丹荷颗粒可显著升高PA诱导的HepG2细胞的存活率。同时选取0.4 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度的丹荷颗粒做后续实验。见表3。

3.2.4 油红O检测丹荷颗粒对PA诱导的HepG2细胞的脂质蓄积的影响 与空白组比较,模型组(300 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PA)HepG2的脂滴显著增多,经

0.4 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 丹荷颗粒干预后,降低PA诱导的HepG2细胞的脂质积累。见图1。



注:A.Control组;B.Model组;C.DHG-H组(图2、图4同)

图1 DHG对PA诱导的HepG2细胞脂质积累的影响(油红O,×400)

Fig. 1 Effect of Danhe granules on PA-induced lipid accumulation in HepG2 cells (oil red O, ×400)

3.3 丹荷颗粒对PA诱导的HepG2细胞ROS的影响 与空白组比较,PA诱导的HepG2细胞ROS荧光强度显著增强,与模型组比较,丹荷颗粒用药组显著降低了HepG2细胞ROS的荧光强度水平

($P<0.01$)。表明丹荷颗粒能抑制细胞中ROS的产生。见图2。

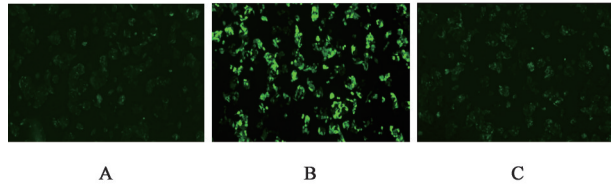


图2 丹荷颗粒对PA诱导HepG2细胞ROS水平的影响(免疫荧光, $\times 200$)

Fig. 2 Effect of Danhe granules on ROS levels in PA-induced HepG2 cells (IF, $\times 200$)

3.4 丹荷颗粒对PA诱导的HepG2细胞MDA、CAT的影响 与空白组比较,PA诱导的HepG2细胞MDA明显处于高水平,CAT处于低水平,差异有统计学意义($P<0.05, P<0.01$);与模型组比较,丹荷颗粒用药组显著降低HepG2细胞MDA水平,明显升高CAT的水平,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表4。

3.5 丹荷颗粒对混合型高脂血症大鼠一般形态及体质量的影响 空白组大鼠体形匀称,毛色光亮、

表4 丹荷颗粒对PA诱导的HepG2细胞MDA、CAT水平的影响($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 4 Effect of Danhe granules on PA-induced MDA, CAT in HepG2 cells ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	质量浓度/ $g\cdot L^{-1}$	MDA	CAT
Control组		10.29 \pm 1.47	3.38 \pm 0.12
Model组		43.06 \pm 10.65 ²⁾	2.54 \pm 0.46 ¹⁾
DHG-H组	0.4	8.30 \pm 2.93 ³⁾	3.85 \pm 0.68 ³⁾

注:与空白组比较¹⁾ $P<0.05$,²⁾ $P<0.01$;与模型组比较³⁾ $P<0.05$

整齐,活动灵敏,反应敏捷,饮食与饮水正常,粪便成形。皮肤紧致、毛发顺滑,整体呈健康状态。经过高脂饲料喂养或复合造模后,混合型高脂血症大鼠表现为体质量明显增加,腹部膨大、皮下脂肪堆积显著。毛色暗淡、粗糙,可见脱毛或皮肤油腻现象,活动减少,精神状态欠佳。部分大鼠出现嗜睡、饮食量波动等表现。给药8周后,与模型组比较,丹荷颗粒各给药组、普伐他汀钠及血脂康组明显降低混合型高脂血症大鼠体质量($P<0.05, P<0.01$),其中丹荷颗粒高剂量组最为显著,差异有统计学意义($P<0.01$)。见表5。

表5 丹荷颗粒对高脂饮食诱导大鼠体质量的影响($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 5 Effect of Danhe granules on body weight in high-fat diet-induced rats ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	剂量/ $g\cdot kg^{-1}$	第0周	第2周	第4周	第6周	第8周
Control组		227.10 \pm 1.89	339.98 \pm 11.73	398.62 \pm 10.86	457.51 \pm 31.27	553.24 \pm 37.10
Model组		227.28 \pm 4.81	353.65 \pm 10.71	418.53 \pm 12.62 ¹⁾	525.42 \pm 15.36 ²⁾	622.64 \pm 28.77 ²⁾
DHG-L组	1.134	228.13 \pm 9.67	345.03 \pm 21.28	387.62 \pm 27.96	459.67 \pm 35.10 ⁴⁾	552.78 \pm 51.40 ⁴⁾
DHG-M组	2.268	224.67 \pm 7.71	355.31 \pm 26.67	400.06 \pm 31.12	471.58 \pm 47.61 ⁴⁾	562.76 \pm 57.80 ³⁾
DHG-H组	4.536	227.04 \pm 8.32	351.12 \pm 15.34	380.18 \pm 32.69 ³⁾	453.18 \pm 52.90 ⁴⁾	536.20 \pm 62.70 ⁴⁾
PST组	4.02 $\times 10^{-3}$	222.93 \pm 9.00	346.62 \pm 24.19	377.99 \pm 33.41 ³⁾	449.28 \pm 45.03 ⁴⁾	539.19 \pm 57.59 ⁴⁾
XZK组	0.12	225.72 \pm 4.07	363.54 \pm 21.92	406.23 \pm 29.62	487.75 \pm 41.89 ³⁾	568.16 \pm 47.34 ³⁾

注:与空白组比较¹⁾ $P<0.05$,²⁾ $P<0.01$;与模型组比较³⁾ $P<0.05$,⁴⁾ $P<0.01$ (表6-表10同)

3.6 丹荷颗粒对混合型高脂血症大鼠脂质的影响 与空白组的大鼠比较,模型组大鼠血清TC、TG和LDL-C水平显著升高($P<0.01$),HDL-C水平及HDL-C/TC比值显著降低($P<0.01$);与模型组比较,丹荷颗粒低、中、高剂量组分别显著降低了大鼠TC、TG和LDL-C水平,差异有统计学意义($P<0.01$),并显著升高HDL-C/TC值,其中以高剂量组最为显著($P<0.01$),但各用药组降低了HDL-C的水平,普伐他汀钠组和血脂康组显著降低了TC、TG、LDL-C水平($P<0.01$),但普伐他汀钠组与血脂康组有升高血清HDL-C/TC值的趋势,差异无统计学意义。HDL-C/TC值用于评估动脉粥样硬化和心血管疾病的风

险,由此表明丹荷颗粒有可能缓解混合型高脂血症大鼠进一步发展为动脉粥样硬化的风险。见表6。在混合型高脂血症中,血脂紊乱会促使肝脏脂质沉积,导致肝脏TC、TG、肝质量和肝指数升高,从而反映其对肝脏的损伤程度。与空白组比较,模型组大鼠肝脏TC、TG水平处于高水平,差异有统计学意义($P<0.01$),肝质量与肝指数显著升高,差异有统计学意义($P<0.01$),与模型组比较,普伐他汀钠及血脂康组的TC、TG水平显著降低,丹荷颗粒各用药组显著降低大鼠TC、TG水平($P<0.01$),丹荷颗粒各剂量组、普伐他汀钠组及血脂康组显著降低混合型高脂血症大鼠的肝质量及肝指数,有效缓解肝损伤。见表7。

表6 丹荷颗粒对混合型高脂血症大鼠血清血脂四项及HDL-C/TC的影响 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 6 Effect of Danhe granules on serum lipids and HDL-C/TC in rats with mixed hyperlipidaemia ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	TC/mmol·L ⁻¹	TG/mmol·L ⁻¹	LDL-C/mmol·L ⁻¹	HDL-C/mmol·L ⁻¹	HDL-C/TC
Control组		0.87±0.05	0.55±0.22	0.77±0.10	2.03±0.40	2.33±0.40
Model组		2.78±0.46 ²⁾	2.54±0.57 ²⁾	1.46±0.30 ²⁾	1.30±0.21 ²⁾	0.48±0.12 ²⁾
DHG-L组	1.134	1.54±0.19 ⁴⁾	1.45±0.70 ⁴⁾	0.87±0.29 ⁴⁾	1.18±0.40	0.78±0.28 ³⁾
DHG-M组	2.268	1.44±0.32 ⁴⁾	1.15±0.30 ⁴⁾	0.90±0.30 ⁴⁾	1.02±0.19	0.72±0.12 ⁴⁾
DHG-H组	4.536	1.12±0.21 ⁴⁾	0.91±0.35 ⁴⁾	0.69±0.15 ⁴⁾	1.17±0.20	1.09±0.33 ⁴⁾
PST组	4.02×10 ⁻³	1.63±0.46 ⁴⁾	0.67±0.32 ⁴⁾	0.91±0.24 ⁴⁾	1.09±0.21	0.73±0.31
XZK组	0.12	1.61±0.36 ⁴⁾	0.77±0.23 ⁴⁾	0.98±0.21 ⁴⁾	0.02±0.34	0.64±0.19

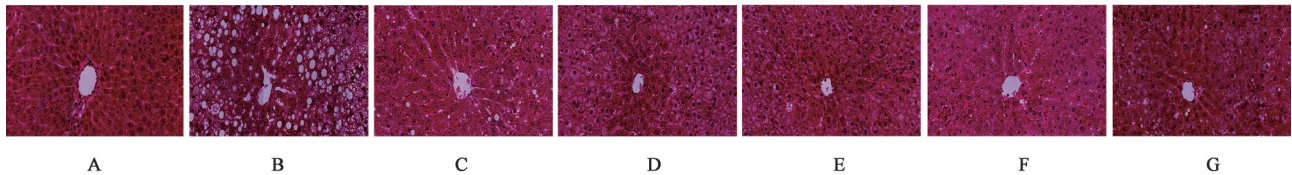
表7 丹荷颗粒对混合型高脂血症大鼠肝脏TC、TG、肝质量及肝指数的影响 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 7 Effect of Danhe granules on liver TC, TG, liver weight and liver index in mixed hyperlipidaemic rats ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	TC/mmol·L ⁻¹	TG/mmol·L ⁻¹	肝质量/g	肝指数
Control组		0.03±0.01	0.15±0.04	16.03±1.29	3.01±0.17
Model组		0.29±0.01 ²⁾	0.68±0.10 ²⁾	30.08±3.44 ²⁾	4.84±0.60 ²⁾
DHG-L组	1.134	0.23±0.05 ³⁾	0.52±0.12 ³⁾	19.66±3.93 ⁴⁾	3.64±0.61 ⁴⁾
DHG-M组	2.268	0.21±0.45 ⁴⁾	0.52±0.56 ⁴⁾	22.48±4.43 ⁴⁾	4.09±0.68 ⁴⁾
DHG-H组	4.536	0.20±0.39 ⁴⁾	0.45±0.37 ⁴⁾	22.89±4.51 ³⁾	4.33±0.46 ⁴⁾
PST组	4.02×10 ⁻³	0.26±0.02 ⁴⁾	0.43±0.75 ⁴⁾	20.55±4.06 ⁴⁾	3.83±0.40 ⁴⁾
XZK组	0.12	0.27±0.02 ³⁾	0.46±0.04 ⁴⁾	22.40±3.13 ⁴⁾	3.93±0.27 ⁴⁾

3.7 丹荷颗粒对混合型高脂血症大鼠肝脏病理形态的影响 HE染色结果显示,空白组大鼠肝组织结构完整,肝索排列有序,肝小叶界限清晰,肝细胞形态正常,与空白组比较,模型组大鼠肝组织出现肝索紊乱、小叶中央肝细胞明显肿胀、脂肪空泡形

成及细胞核受压偏位等病理改变。各给药组(丹荷颗粒低、中、高剂量组、普伐他汀钠组及血脂康组)均能不同程度改善上述肝脏病变,且丹荷颗粒的改善作用呈剂量相关性,其中高剂量组对肝组织脂肪堆积及变性的恢复程度与阳性药组相近。见图3。



注:A.Control组;B.Model组;C.DHG-L组;D.DHG-M组;E.DHG-H组;F.PST组;G.XZK组
图3 丹荷颗粒对混合型高脂血症大鼠肝病理形态的影响(HE, ×400)

Fig. 3 Effect of Danhe granules on histopathological morphology of liver in rats with mixed hyperlipidaemia (HE, ×400)

3.8 丹荷颗粒对混合型高脂血症大鼠肝脏SREBP1、PPAR α 、LPL表达的影响 与空白组比较,模型组大鼠肝脏p-SREBP1、SREBP1蛋白表达量明显升高,PPAR α 与LPL蛋白表达水平明显降低($P<0.05, P<0.01$);与模型组比较,丹荷颗粒用药组显著降低大鼠肝脏p-SREBP1、SREBP1水平($P<0.01$),明显升高PPAR α 与LPL水平($P<0.05$),见表8、图4。与空白组比较,模型组大鼠肝脏SRBEP1 mRNA表达显著升高($P<0.01$),LPL mRNA表达显著降低($P<0.01$);与模型组比较,丹荷颗粒用药组显著降

低大鼠肝脏SREBP1 mRNA水平,升高大鼠肝脏LPL mRNA水平($P<0.01$),见表9。

3.9 丹荷颗粒抑制混合型高脂血症大鼠的氧化应激 与空白组比较,模型组大鼠肝脏MDA处于高水平,SOD和CAT处于较低水平($P<0.01$);与模型组比较,丹荷颗粒各给药组、普伐他汀钠及血脂康显著降低大鼠肝脏MDA水平,升高SOD和CAT的水平($P<0.01$),并且丹荷颗粒的效果与给药剂量呈正相关。由此可以看出丹荷颗粒抑制混合型高脂血症大鼠的氧化应激。见表10。

表8 丹荷颗粒对高脂饮食诱导大鼠肝组织中SREBP1、PPAR α 及LPL蛋白表达的影响 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 8 Effect of Danhe granules on SREBP1, PPAR α and LPL protein expression in liver tissue of rats induced by a high-fat diet following administration ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	p-SREBP1/ β -actin	SREBP1/ β -actin	PPAR α / β -actin	LPL/ β -actin
Control组		0.65 \pm 0.12	0.70 \pm 0.05	1.21 \pm 0.21	1.24 \pm 0.10
Model组		0.91 \pm 0.04 ¹⁾	0.92 \pm 0.04 ²⁾	0.84 \pm 0.04 ¹⁾	0.93 \pm 0.02 ²⁾
DHG-H组	4.536	0.71 \pm 0.01 ⁴⁾	0.60 \pm 0.03 ⁴⁾	1.03 \pm 0.09 ³⁾	1.02 \pm 0.15 ³⁾

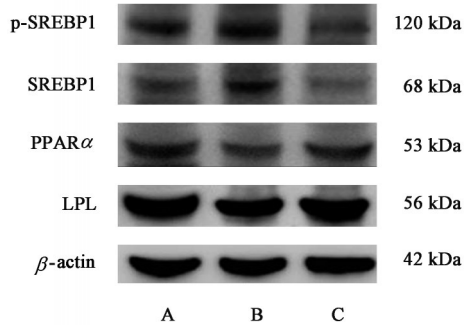


图4 各组大鼠肝组织中SREBP1、PPAR α 及LPL蛋白表达电泳

Fig. 4 Electrophoresis of protein expressions of SREBP1, PPAR α and LPL in liver tissues of each group of rats

表9 丹荷颗粒对混合型高脂血症大鼠肝脏的SREBP1、LPL mRNA表达水平的影响 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 9 Effect of Danhe granules on SREBP1 and LPL mRNA expression levels in liver of rats with mixed hyperlipidaemia ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	SREBP1	LPL
Control组		1.00 \pm 0.00	1.00 \pm 0.00
Model组		1.90 \pm 0.29 ²⁾	0.58 \pm 0.03 ²⁾
DHG-H组	4.536	0.81 \pm 0.11 ⁴⁾	0.85 \pm 0.04 ⁴⁾

表10 丹荷颗粒对混合型高脂血症大鼠肝脏MDA、SOD、CAT水平的影响 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 10 Effect of Danhe granules on levels of liver MDA, SOD, CAT in mixed hyperlipidaemic rats ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	MDA /nmol·g ⁻¹	SOD /mg·g ⁻¹	CAT /U·g ⁻¹
Control组		4.49 \pm 1.46	6.57 \pm 0.20	8.51 \pm 0.13
Model组		11.92 \pm 0.57 ²⁾	3.57 \pm 0.05 ²⁾	3.36 \pm 0.12 ²⁾
DHG-L组	1.134	6.65 \pm 0.56 ⁴⁾	4.12 \pm 0.22 ⁴⁾	4.81 \pm 0.51 ⁴⁾
DHG-M组	2.268	5.60 \pm 1.65 ⁴⁾	4.43 \pm 0.19 ⁴⁾	5.12 \pm 0.38 ⁴⁾
DHG-H组	4.536	3.12 \pm 1.33 ⁴⁾	5.15 \pm 0.35 ⁴⁾	5.60 \pm 0.41 ⁴⁾
PST组	4.02 \times 10 ⁻³	4.94 \pm 0.93 ⁴⁾	5.46 \pm 0.33 ⁴⁾	5.63 \pm 0.11 ⁴⁾
XZK组	0.12	5.56 \pm 1.76 ⁴⁾	4.10 \pm 0.21 ⁴⁾	4.42 \pm 0.56 ⁴⁾

4 讨论

混合型高脂血症患者血浆中TC、TG及LDL-C水平均显著升高,大量游离脂肪酸回流至肝脏后,促进脂滴异常蓄积,破坏线粒体和内质网稳态,增

加ROS生成并诱导氧化应激,激活多种炎症通路^[13],引发肝细胞结构与功能损伤^[14]。同时,肝细胞损伤还会影响极低密度脂蛋白(VLDL)的合成与分泌,引发血脂转运障碍,加重血脂代谢紊乱并形成恶性循环^[15],此时,使用肝损降脂药物无异于雪上加霜。因此,降脂保肝抗氧化成为首选治疗策略。

中医典籍虽无“混合型高脂血症”之名,但学界多将其归属于“脂浊”“膏浊”范畴^[16-17]。其病机与脾胃运化失司、气滞血瘀及湿热内蕴相关。脾失健运则精微不化,胃失降浊则水谷停滞,久之化为脂毒瘀滞,加重脏腑经络阻塞。丹荷颗粒由丹参、虎杖、山楂、陈皮、薏苡仁及荷叶组成,具有活血祛瘀、健脾化痰、降浊去脂的综合功效。

网络药理学分析显示,丹荷颗粒的主要活性成分包括槲皮素、木犀草素、山柰酚、柚皮素及异鼠李素等,关键靶点涵盖PPARG、PPARA、TNF、IL-6、IL-1 β 、Akt1等,富集通路主要涉及PPARA、AGE/RAGE、脂质代谢与动脉粥样硬化及非酒精性脂肪性肝病等。分子对接结果提示,槲皮素、木犀草素、山柰酚及柚皮素与PPARA的结合能分别为-8.3、-8.0、-8.1及-7.2 kcal·mol⁻¹,具有较强的亲和力。PPAR α 是脂质代谢的核心转录因子^[18],一方面增强脂肪酸 β 氧化,减少肝细胞中脂质积累和活性氧产生抑制氧化应激^[19],另一方面下调SREBP1抑制脂肪酸和TG的从头合成^[20],同时能上调LPL促进TG水解^[21],因此在脂代谢和抗氧化中均发挥关键作用。现代药理研究表明,山楂叶黄酮通过抑制高脂血症小鼠和巨噬细胞中的固醇调节元件蛋白2(SREBP2)和低密度脂蛋白受体(LDLR)的表达缓解动脉粥样硬化^[22];荷叶碱可上调脂酶活性、降低氧化应激、抑制SREBP1、脂肪酸合成酶(FAS)、硬脂酰辅酶A去饱和酶-1(SCD-1)、过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (PPAR γ)等脂质合成基因,改善小鼠的高脂血症^[23];槲皮素可调控腺苷酸活化蛋白激酶(AMPK)^[24]、沉默信息调节因子(SIRT1)^[25]、Akt^[26]等诸多信号通路,减轻氧化应激与炎症反应;

木犀草素能够纠正糖脂代谢紊乱,通过核因子E₂相关因子2(Nrf2)/血红素氧合酶1(HMOX1)途径改善肝脏内氧化应激^[27-28];山柰酚可通过组蛋白去乙酰化酶3(HDAC3)/Nrf2通路缓解氧化应激^[29]。这些研究从现代生物学角度印证了丹荷颗粒在氧化应激方面的独特调节作用。也为进一步揭示中医药“君臣佐使”配伍规律提供了科学支撑。

细胞实验显示,丹荷颗粒显著降低了PA诱导的HepG2细胞脂滴积累,和ROS、MDA水平,并提高CAT活性。ROS是氧化应激的主要介导因子^[30],高脂负荷可导致肝细胞内ROS过量生成,可氧化细胞膜并诱发心血管疾病。脂质过氧化作用加强会产生大量MDA作为脂质过氧化的典型终产物,其水平升高常提示氧化应激损伤的加剧^[31]。CAT是抗氧化应激的关键酶,可消除过量的ROS,免受分子自由基损伤^[32]。丹荷颗粒干预后ROS的绿色荧光强度减弱,MDA下降、CAT上升,说明其增强了细胞的抗氧化能力,能有效减轻氧化应激介导的脂质代谢紊乱。

动物实验结果进一步证实,丹荷颗粒可显著降低TC、TG,提高HDL-C/TC值,改善血脂紊乱,降低动脉粥样硬化风险;减少肝脏脂质沉积并降低MDA,升高SOD、CAT,显示其在改善血脂及增强抗氧化能力方面的显著优势。SOD是清除超氧阴离子的重要抗氧化酶,能抑制脂质过氧化并保护组织^[33]。丹荷颗粒在高脂模型大鼠中呈剂量依赖性改善MDA、SOD、CAT水平,高剂量组效果优于普伐他汀钠和血脂康。Western blot显示丹荷颗粒能上调PPAR α 、LPL并抑制SREBP1;Real-time PCR结果提示,SREBP1 mRNA与LPL mRNA的变化与蛋白结果趋势一致,而PPAR α mRNA未见显著差异,提示其蛋白水平可能通过翻译后调控或其他信号途径上调。

PPAR α 下游关键节点LPL与SREBP1分别代表脂解与脂质合成2个代谢方向,可较为全面地反映混合型高脂血症大鼠肝脏脂质代谢的状态。然而本研究仍存在不足:一方面尚未深入探索PPAR α 在氧化应激通路中的下游分子机制;另一方面,丹荷颗粒活性成分及其与靶点的直接作用也需进一步验证。未来将利用蛋白组学、转录组学系统筛选PPAR α 下游关键分子,并通过基因敲低/过表达技术构建细胞模型,完善氧化应激相关证据链。同时,采用液相色谱-串联质谱技术鉴定入血成分,并结合表面等离子共振技术、分子动力学模拟技术等揭示

丹荷颗粒在脂质代谢网络中的多靶点调控机制。

综上所述,丹荷颗粒可以通过降低MDA,升高SOD、CAT的水平,消除过量的ROS,抑制氧化应激,并减轻肝损伤,同时上调PPAR α 、LPL表达水平,抑制SREBP1表达水平,改善脂质代谢紊乱,为混合型高脂血症的防治提供了实验依据和理论支持。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] 《混合型高脂血症基层诊疗中国专家共识(2024年)》编写专家组. 混合型高脂血症基层诊疗中国专家共识(2024年)[J]. 中华全科医师杂志, 2024, 23(9): 907-917.
Expert Group on Chinese Expert Consensus on the Diagnosis and Treatment of Mixed Hyperlipidemia in Primary Care (2024). Chinese expert consensus on the diagnosis and treatment of mixed hyperlipidemia in primary care (2024)[J]. Chin J Gen Pract, 2024, 23(9): 907-917.
- [2] ZHAO S, WANG Y, MU Y, et al. Prevalence of dyslipidaemia in patients treated with lipid-lowering agents in China: Results of the DYSlipidemia International Study (DYSIS)[J]. Atherosclerosis, 2014, 235(2): 463-469.
- [3] VEKIC J, STROMSNES K, MAZZALAI S, et al. Oxidative stress, atherogenic dyslipidemia, and cardiovascular risk[J]. Biomedicines, 2023, 11(11): 2897.
- [4] SINGH U, JIALAL I. Oxidative stress and atherosclerosis[J]. Pathophysiology, 2006, 13(3): 129-142.
- [5] XU D, XIE L, CHENG C, et al. Triglyceride-rich lipoproteins and cardiovascular diseases[J]. Front Endocrinol, 2024, 15: 1409653.
- [6] SOBUKAWA Y, HATTA T, FUNAKI D, et al. Safety of combined statin and fibrate therapy: Risks of liver injury and acute kidney injury in a cohort study from the shizuoka kokuho database[J]. Drugs Real World Outcomes, 2024, 11(2): 317-330.
- [7] 潘绮雪, 陈奎奎, 马兆臣, 等. 基于体内暴露量的丹荷颗粒质量标志物研究[J]. 中草药, 2021, 52(9): 2608-2616.
PAN Q X, CHEN K K, MA Z C, et al. Study on Q-Marker of Danhe granules based on exposure *in vivo* [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2021, 52(9): 2608-2616.
- [8] 于彤, 张珊, 乔艳芳, 等. 多角度探讨丹荷颗粒对于高胆固醇大鼠脾虚证候的改善作用[J]. 辽宁中医药大学学报, 2023, 25(8): 10-14.
YU T, ZHANG S, QIAO Y, et al. Investigation of the effect of Danhe granule on treating spleen deficiency syndrome in hypercholesterolemia rats [J]. J Liaoning Univ Tradit Chin Med, 2023, 25(8): 10-14.
- [9] 于彤, 张珊, 乔艳芳, 等. 丹荷颗粒对高胆固醇血症大鼠肝脏超微结构及SREBP-1、LXR α 、RXRA蛋白表达的影响[J]. 中国中医药信息杂志, 2023, 30(11): 80-85.
YU T, ZHANG S, QIAO Y, et al. Effects of Danhe granules on liver ultrastructure and SREBP-1, LXR α , RXRA proteins

- expression in hypercholesterolemic rats[J]. *Chin J Inf Tradit Chin Med*, 2023, 30(11): 80-85.
- [10] MATTEO R, ROSARIA M O, LUCIA C, et al. Differential effect of oleic and palmitic acid on lipid accumulation and apoptosis in cultured hepatocytes[J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2009, 24(5): 830-840.
- [11] ALNAHDI A, JOHN A, RAZA H. Augmentation of glucotoxicity, oxidative stress, apoptosis and mitochondrial dysfunction in HepG2 cells by palmitic acid[J]. *Nutrients*, 2019, 11(9): 1979.
- [12] GUNILLA O. Role of lipoprotein lipase in lipid metabolism [J]. *Curr Opin Lipidol*, 2016, 27(3): 233-241.
- [13] MARTINS I V, RIVERS-AUTY J, ALLAN S M, et al. Mitochondrial abnormalities and synaptic loss underlie memory deficits seen in mouse models of obesity and Alzheimer's disease [J]. *J Alzheimers Dis*, 2017, 55 (3) : 915-932.
- [14] YUN F L, JUN Z H, LI Z, et al. The effects of needling fenglong (ST40) and neiguan (PC6) on IL-17 of ApoE-Gene-Knockout mice's liver [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2014, 2014(3): 691863.
- [15] JOERG H, LUDGER S. Metabolic-associated fatty liver disease and lipoprotein metabolism[J]. *Mol Metab*, 2021, 50: 101238.
- [16] 全小林, 刘文科. 论膏浊病[J]. *中医杂志*, 2011, 52(10): 816-818.
- TONG X L, LIU W K. On the disease of Gaozhuo [J]. *J Tradit Chin Med*, 2011, 52(10): 816-818.
- [17] 王新陆. 血浊证的辨证治疗[J]. *山东中医杂志*, 2007, 26(1): 3-5.
- WANG X L. Diagnosis and treatment of syndrome of turbid blood[J]. *Shandong J Tradit Chin Med*, 2007, 26(1): 3-5.
- [18] 冯帅霞, 徐莹, 韩涵. 过氧化物酶体增殖物激活受体(PPAR)在肝脏疾病中的作用及潜在意义[J]. *临床肝胆病杂志*, 2023, 39(7): 1747-1753.
- FENG S X, XU Y, HAN H. Role and potential significance of peroxisome proliferator-activated receptors in liver diseases [J] *J Clin Hepatol*, 2023, 39(7): 1747-1753.
- [19] JIN-LIAN L, QIAO-YUN W, HAI-YUN L, et al. Effects of L-carnitine against oxidative stress in human hepatocytes: Involvement of peroxisome proliferator-activated receptor alpha[J]. *J Biomed Sci*, 2012, 19(1): 32.
- [20] TOMOHIRO Y, TOMOHIRO I, HITOSHI S, et al. Cross-talk between peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) alpha and liver X receptor (LXR) in nutritional regulation of fatty acid metabolism. I. PPARs suppress sterol regulatory element binding protein-1c promoter through inhibition of LXR signaling[J]. *Mol Endocrinol*, 2003, 17(7): 1240-1254.
- [21] FRUCHART J. Peroxisome proliferator-activated receptor- α activation and high-density lipoprotein metabolism[J]. *Am J Cardiol*, 2001, 88(12S1): 24-29.
- [22] BAI X, WANG S, SHU L, et al. Hawthorn leaf flavonoids alleviate the deterioration of atherosclerosis by inhibiting SCAP-SREBP2-LDLR pathway through sPLA2- II_A signaling in macrophages in mice [J]. *J Ethnopharmacol*, 2024, 327: 118006.
- [23] 张丽静, 艾耀伟, 王政强. 荷叶碱防治小鼠高脂血症作用及其机制[J]. *医药导报*, 2015, 34(4): 440-444.
- ZHANG L J, AI Y W, WANG Z Q. Effects of nuciferine on mice with hyperlipidemia and its mechanisms [J]. *Her Med*, 2015, 34(4): 440-444.
- [24] PENG C, YI W, CONG Z, et al. Quercetin ameliorates non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) via the promotion of AMPK-mediated hepatic mitophagy [J]. *J Nutr Biochem*, 2023, 120: 109414.
- [25] ZHIFU C, XINGTAO Z, KWAME F A, et al. Therapeutic application of quercetin in aging-related diseases: SIRT1 as a potential mechanism [J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 943321.
- [26] SANDRA P, ÁNGEL M, VICTORIA M G, et al. Quercetin ameliorates dysregulation of lipid metabolism genes via the PI3K/Akt pathway in a diet-induced mouse model of nonalcoholic fatty liver disease [J]. *Mol Nutr Food Res*, 2015, 59(5): 879-93.
- [27] 许奇, 张洪榕, 阮诺冰, 等. 基于人工智能辅助药物质量评价结合药效学研究木犀草素对 db/db 小鼠糖脂代谢及肝脏氧化应激损伤的作用及机制 [J]. *中国药理学通报*, 2025, 41(2): 323-333.
- XU Q, ZHANG H R, RUAN N B, et al. Effects of luteolin on glucose and lipid metabolism and liver oxidative stress injury in db/db mice based on artificial intelligence assisted drug quality evaluation and pharmacodynamics and its mechanisms [J]. *Chin Pharmacol Bull*, 2025, 41(2): 323-333.
- [28] XIANG M, LIN X, CHEN H. Luteolin inhibits ferroptosis of HUVEC by regulating the Sirt1/Nrf2 pathway [J]. *Cell Biochem Biophys*, 2025, 83(4): 1-14.
- [29] YUE Z, ZHANG Y, ZHANG W, et al. Kaempferol alleviates myocardial ischemia injury by reducing oxidative stress via the HDAC3-mediated Nrf2 signaling pathway [J]. *J Adv Res*, 2024, 75755-75764.
- [30] LEI W, FEI Z, WUXUN P, et al. Preincubation with a low-dose hydrogen peroxide enhances anti-oxidative stress ability of BMSCs [J]. *J Orthop Surg Res*, 2020, 15(1): 392-392.
- [31] ANTONIO A, F M M, SANDRO A. Lipid peroxidation: Production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2014, 2014: 360438.
- [32] HUI Z, CHAOHUA L, DONG Z, et al. Wuliangye Baijiu but not ethanol reduces cardiovascular disease risks in a zebrafish thrombosis model [J]. *NPJ Sci Food*, 2022, 6(1): 55.
- [33] SHIQI C, XIAOXIAO W, TONG L, et al. The improvement of cardiac and endothelial functions of Xue-Fu-Zhu-Yu decoction for patients with acute coronary syndrome: A meta-analysis of randomized controlled trials [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2022, doi: 10.1155/2022/2671343.

[责任编辑 周冰冰]