

沙棘叶治疗高脂血症的药效物质基础

唐瑜, 张依娜, 邹远荣, 乔佳欣, 刘思雨, 高峰*

(陕西中医药大学药学院, 陕西 咸阳 712046)

[摘要] 目的:应用网络药理学和实验验证,分析沙棘叶治疗高脂血症的药效物质基础。方法:建立油酸-棕榈酸(摩尔比2:1)诱导的HepG2高脂细胞模型,细胞增殖与活性检测法(CCK-8)确定沙棘叶含药血清的最适给药浓度,并利用沙棘叶含药血清对细胞进行干预,进行油红O染色确定其造模成功,应用酶联免疫吸附测定法(ELISA)测定细胞的总胆固醇(TG)和甘油三酯(TC)含量。应用网络药理学分析可能的作用机制;分子对接确定潜在作用靶点的作用能力。结果:CCK-8实验表明,10%含药血清浓度为细胞生长的最适浓度,油红O染色表明,经油酸-棕榈酸(摩尔比2:1)诱导的高脂细胞模型已经形成;经含药血清处理后,细胞的总胆固醇(TG)、甘油三酯(TC)含量均下降,表明沙棘叶对高脂血症具有良好的治疗作用。网络药理学分析发现,沙棘叶治疗高脂血症的核心靶点为血清白蛋白(ALB)、过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (PPAR γ)、基质金属蛋白酶-9(MMP-9)等,涉及755条生物过程,73条分子功能,3种细胞组成;京都基因与基因组百科全书(KEGG)分析表明沙棘叶治疗高脂血症涉及PPAR信号通路、缺氧诱导因子(HIF)-1信号通路、AMP活化蛋白激酶(AMPK)信号通路等多条通路。结论:10%沙棘叶含药血清可降低高脂细胞模型的脂质累积和降低细胞内的TG、TC水平。网络药理学研究表明其作用机制可能是通过激活PPAR信号通路等实现的。

[关键词] 沙棘叶; 高脂血症; 作用机制; 分子对接

[中图分类号] R285;R289;R22;R2-031;R33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2022)22-0116-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20221019 **[增强出版附件]** 内容详见<http://www.syfjxzz.com>或<http://cnki.net>

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20220623.1804.002.html>

[网络出版日期] 2022-06-24 16:43

Pharmacodynamic Material Basis of Hippophae Folium in Treatment of Hyperlipidemia

TANG Yu, ZHANG Yina, ZOU Yuanrong, QIAO Jiabin, LIU Siyu, GAO Feng*

(College of Pharmacy, Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang 712046, China)

[Abstract] **Objective:** To analyze the pharmacodynamic material basis of Hippophae Folium in the treatment of hyperlipidemia by network pharmacology and experimental verification. **Method:** The hyperlipidemic HepG2 cell model induced by oleic and palmitic acid (molar ratio 2:1) was established. The optimal concentration of Hippophae Folium containing serum was determined by cell counting kit (CCK)-8 method. The cells were intervened by the medicated serum, and oil red O staining was used to determine the success of the model. The contents of total cholesterol (TC) and triglyceride (TG) were determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The possible mechanism of action was analyzed by network pharmacology, and molecular docking was performed to detect the binding ability of the potential targets. **Result:** CCK-8 assay showed that 10% medicated serum was the optimal concentration for cell growth. Oil red O staining proved that the hyperlipidemic cell model induced by oleic and palmitic acid has been built. After treatment with medicated serum, the contents of TG and TC decreased, indicating that Hippophae Folium had a

[收稿日期] 2022-01-09

[基金项目] 陕西省中医药管理局项目(2021-02-ZZ-008);咸阳市二〇二〇年重点研发计划项目(2020K02-96);咸阳市科技局-基于沙棘果渣及叶废弃资源循环利用的沙棘类产品的研究与开发项目(2019K02-121);陕西省教育厅重点项目(20JC011)

[第一作者] 唐瑜,在读硕士,从事中药药性理论研究,E-mail:1225632932@qq.com

[通信作者] *高峰,博士,副教授,从事中药药性理论研究,E-mail:7204612@qq.com

good therapeutic effect on hyperlipidemia. Network pharmacology revealed that the core targets of Hippophae Folium in the treatment of hyperlipidemia were albumin (ALB), peroxisome proliferative activated receptor γ (PPAR γ) and matrix metalloprotein(MMP)-9, involving 755 biological processes, 73 molecular functions and 3 cellular components. By Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes(KEGG) analysis, it was found PPAR, hypoxia inducible factor (HIF)-1, AMP-activated protein kinase (AMPK) and other signal pathways were involved in the treatment of hyperlipidemia by Hippophae Folium. **Conclusion:** Hippophae Folium containing serum (10%) could reduce lipid accumulation and intracellular TG and TC levels in hyperlipidemic cell model, and its mechanism of action might be realized by activating PPAR signal pathway.

[**Keywords**] Hippophae Folium; hyperlipidemia; mechanism of action; molecular docking

高脂血症是一种脂质代谢异常疾病,其特征是总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)升高和低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)水平上升,或伴随着高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)循环水平的降低^[1]。随着经济的发展和人民生活水平的提高,高脂血症已成为危害全球人民身体健康的危险因素,高脂血症与心血管疾病密不可分。高脂血症会增加非缺血性心力衰竭的风险,直接影响心脏的收缩功能和心脏电生理反应^[2]。目前对于高脂血症的治疗以他汀类药物为主,虽见效快,但长期服用可能会导致一系列的不良反应,因此,开发疗效稳定和不良反应较小的中药降脂药物成为近年来研究的热点。

沙棘是一种胡颓子科落叶性灌木或乔木,近年来,沙棘因其独特而丰富的营养物质和生物活性成分,受到人们的广泛欢迎,但是对于沙棘的研究利用侧重于沙棘果,对于沙棘叶的研究相对较少,经查阅相关文献^[3-7],沙棘叶含有丰富的黄酮类、鞣质等成分,具有良好的降脂与减肥活性。课题组前期对沙棘叶的研究利用情况进行梳理,本研究在此基础上着重探究沙棘叶的降脂活性,以期对中药降脂新药的开发提供实验依据。

网络药理学是建立在“药物-靶点-疾病”多层次的网络基础上的新兴领域,其主要从多种靶点的相互作用来研究疾病的治疗,广泛用于医学领域。网络药理学可以与药物靶点筛选结合以便于寻找具有治疗价值的活性成分化合物,也可将中药质量标记与化学成分分析相结合进行质量控制。中药复杂的化学成分和分子机制在治疗疾病方面具有非常大的优势,因其针对于疾病的多种生物过程,通常被认为是治疗复杂疾病的有效方法^[8]。中药治疗疾病的多靶点、多通路的特点与网络药理学的应用优势是一致的。因此,本研究在前期的实验基础上,采用网络药理学研究方法,构建药物-疾病-靶点网络,通过基因本体(GO)富集分析和京都基因与

基因组百科全书(KEGG)通路富集分析进一步研究沙棘叶治疗高脂血症的活性成分和潜在作用机制,完善沙棘叶降脂的药效物质基础。

1 沙棘叶降低 HepG2 细胞脂质累积的药效学研究

1.1 动物与细胞 SPF级SD大鼠18只,体质量(200±20)g,购买自成都达硕实验动物有限公司,合格证号SCXK(川)2020-030;经陕西中医药大学伦理委员会批准,伦理号SUCMDL20210625001。人肝癌细胞(HepG2细胞,批号2021082409)购自博士德生物工程有限公司,待细胞传至第3代后选择对数生长期的细胞进行后续实验。

1.2 材料

1.2.1 仪器 BPN-40RHP型CO₂恒温培养箱(美国Thermo公司);Eon型微孔板分光光度计(美国BioTek公司);Centrifuge 5810型高速台式离心机(德国Eppendorf公司)。

1.2.2 试剂 胎牛血清(四季青公司,批号20210954),DMEM基础培养基(博士德生物工程有限公司,批号202112809),胰蛋白酶(碧云天生物技术有限公司,批号20211658),细胞增殖与活性检测(CCK-8)试剂盒、油红O染色试剂盒(北京索莱宝科技有限公司,批号分别为20213910、2021280910),实验用高脂细胞添加剂(西安鲲鹏创科技有限公司,批号20211126),G试剂盒、TC试剂盒(南京建成生物科技有限公司,批号分别为SE20139221、EA20182348)。

1.3 药物 沙棘产自陕西省榆林市,经陕西中医药大学临床中药学教研室卫培峰老师鉴定为胡颓子科沙棘 *Hippophae rhamnoides* 叶;辛伐他汀片(山东鑫齐药业有限公司,规格20mg×20片,批号20200903)。

1.4 沙棘叶含药血清的制备

1.4.1 沙棘叶水煎液的制备 将沙棘叶按照料液质量(1:10)的比例进行煎煮,煎煮2次,共煎煮

120 min后过滤,弃去滤渣,合并两次煎煮液,浓缩至含生药量为 $2\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的沙棘叶水煎液。

1.4.2 沙棘叶含药血清的制备 SD大鼠18只,适应性喂养1周后将其分为3组,每组6只,分为沙棘叶水煎液组($2.16\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$)、辛伐他汀组($0.002\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$)、空白组。给药组灌胃剂量根据《药理实验方法学》^[9]中人与大鼠的等效剂量换算得来,灌胃体积为 $10\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$,空白组给予相同体积的生理盐水,每天灌胃2次,给药7 d,末次给药2 h后,麻醉,腹主动脉采血, $3\ 000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心15 min(离心半径5.96 cm,下同),离心后, $56\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴灭活30 min,保存备用。

1.5 HepG2细胞的培养及高脂细胞模型的建立

1.5.1 细胞培养 取正在对数期生长的人肝癌细胞(HepG2细胞)接种于含有10%胎牛血清的DMEM培养基(以下简称“完全培养基”)的培养瓶中,放入 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$,5% CO_2 的培养箱中培养(培养条件下同),每隔24 h换液1次,待贴壁的细胞生长到80%左右时,使用0.25%的胰酶消化,进行传代等后续操作。

1.5.2 高脂细胞模型的建立 取对数期生长的人肝癌细胞以 2×10^6 个/孔的密度接种于6孔板内,24 h后待细胞贴壁后弃去原有培养基,每孔添加含有油酸-棕榈酸(摩尔比2:1)的完全培养基,培养48 h后采用油红O染色检测脂滴形成情况。

1.6 CCK-8法检测含药血清最适给药浓度 取对数期生长的HepG2细胞,以 1.5×10^6 个/孔的密度接种于96孔板中,24 h细胞贴壁后弃去原培养基,分别加入10%、15%、20%、25%的含药血清,并采用10%胎牛血清做空白组,24 h后每孔加入CCK-8试剂 $10\text{ }\mu\text{L}$,于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养箱中孵育40 min后用酶标仪于490 nm处测定吸光度 A ,计算其细胞存活率,细胞存活率= $(A_{\text{含药血清}}-A_{\text{空白}})/(A_{\text{对照}}-A_{\text{空白}})\times 100\%$ 。

1.7 HepG2细胞内TC、TG含量的测定 细胞培养及种板方法同上,细胞培养贴壁并用油酸-棕榈酸(摩尔比2:1)诱导高脂细胞模型后,弃去原培养基,给药组分别加入沙棘叶含药血清、空白含药血清、辛伐他汀含药血清进行干预,模型组继续采用油酸-棕榈酸试剂诱导,加入含药血清24 h后,弃去含药血清,每孔加入胰酶 $500\text{ }\mu\text{L}$ 消化贴壁细胞,将消化完成的贴壁细胞转移至 1.5 mL 离心管内, $1\ 000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心5 min,弃上清液,留细胞沉淀,用 $0.1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 磷酸盐缓冲液(PBS)清洗1~2次,再次离心,弃上清液,加入的PBS 0.2 mL ,在冰水浴条件下

使用超声破碎,3~5 s/次,间隔30 s,重复3~5次,制备好的匀浆液按照TG、TC说明书加样,510 nm处用微孔板分光光度计测定其 A ^[10]。

1.8 统计学方法 采用SPSS 26.0软件进行统计分析,数据结果用 $\bar{x}\pm s$ 表示。多组数据之间比较采用单因素方差分析, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 网络药理学分析沙棘叶降血脂的作用机制

2.1 数据与软件 Pubchem数据库(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)、SwissTargetPrediction靶点预测数据库(<http://www.swisstargetprediction.ch/>)、DrugBank药物数据库(<https://go.drugbank.com/>)、UniProt数据库(<https://www.uniprot.org/>)、在线人类孟德尔遗传(OMIM)数据库(<https://omim.org/>)、GeneCards数据库(<https://www.genecards.org/>)、网络拓扑数据分析软件Cytoscape 3.7.1、蛋白质相互作用平台STRING 11.0(<https://string-db.org/>)、R 4.1.0。

2.2 沙棘叶潜在靶点的预测 通过查阅相关文献整理沙棘叶的化学成分,在Pubchem数据库(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)中得到相关化学成分的结构式,利用SwissTargetPrediction数据库(<http://www.swisstargetprediction.ch/>)筛选潜在活性靶点,利用该数据库中的Swiss ADME功能进行ADME筛选,得到沙棘叶的潜在活性靶点。

2.3 沙棘叶治疗高脂血症相关靶点的预测 以“hyperlipoidemia”为关键词在DrugBank药物数据库(<https://go.drugbank.com/>)、OMIM数据库(<https://omim.org/>)、GeneCards数据库(<https://www.genecards.org/>)搜索高脂血症的相关基因靶点,整理后用韦恩图取沙棘叶成分靶点和高脂血症疾病靶点的交集,从而得到沙棘叶治疗高脂血症的相关靶点。

2.4 药物-疾病-靶点网络的构建 Cytoscape 3.7.1是一款图形化显示网络并进行分析和编辑的软件,可以利用自身以及第三方开发的大量功能插件针对网络问题进行深入分析。将用韦恩图处理好的沙棘叶成分和沙棘叶与高脂血症的交集靶点数据导入Cytoscape 3.7.1软件中,构建药物-疾病-靶点网络。

2.5 靶标之间蛋白互作网络的构建 在网络药理学研究中,STRING数据库通常被应用于构建靶标蛋白之间的蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)网络。将Venn图处理后的交集靶点去重后导入到STRING数据库中,设置Organism为“homo sapiens”后进行

搜索,将处理好的数据导入 Cytoscape3.7.1 软件中,利用软件自带的 Network Analysis 插件进行网络拓扑分析,按照靶点的 Degree 值进行取中位数,构建蛋白-蛋白相互作用网络并根据 Degree 值大小筛选核心靶点。

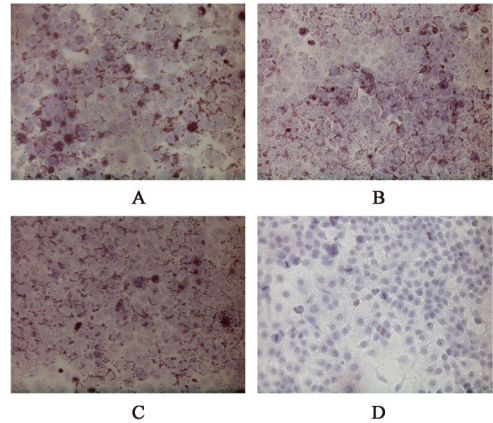
2.6 药物与疾病共有靶点的 GO 富集分析和 KEGG 通路富集分析 以标准基因名的形式将活性成分的关键靶标基因列表导入 DAVID 6.8.0 数据库 (<https://david.ncifcrf.gov/>),对作用靶点进行 GO 富集分析和 KEGG 通路富集分析,整理数据后进行导入 R4.1.0 软件可视化处理。

3 结果

3.1 含药血清最适浓度的确定 CCK-8 实验结果表明,经 10%、15%、20%、25% 的含药血清干预后,与空白组比较,10% 含药血清存活率最适,因此选取 10% 含药血清浓度进行下一步实验。见增强出版附加材料。

3.2 HepG2 细胞脂质积累情况 油红 O 染色结果表明,模型组经油酸-棕榈酸(摩尔比 2:1)诱导 48 h 后,HepG2 细胞内出现了大量脂质积累,经含药血清干预后,脂质积累有所减轻,正常组经染色后无

明显脂质累积。见图 1。



注:A.模型组;B.沙棘叶含药血清组;C.辛伐他汀含药血清组;D.正常组

图1 沙棘叶含药血清对 HepG2 细胞的影响(油红 O 染色,×400)

Fig. 1 Effects of drug-containing serum from Hippophae Folium on HepG2 cells (Oil red O, ×400)

表1 HepG2 细胞内 TG、TC 含量 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	TG	TC
模型组		0.522 3±0.427 9	0.706 2±0.231 9
空白组		0.035 3±0.007 6 ¹⁾	0.036 6±0.020 0 ²⁾
沙棘叶含药血清组	2.16	0.158 7±0.103 6	0.002 8±0.001 0 ²⁾
辛伐他汀含药血清组	0.002 1	0.171 7±0.170 1	0.002 3±0.001 1 ²⁾

注:与模型组比较¹⁾P<0.05,²⁾P<0.01

3.4 沙棘叶的活性成分及潜在靶点预测结果 经过查阅相关文献并且经过 SwissTargetPrediction 数据库的 Swiss ADME 功能筛选之后,按照“Probability>0”的原则预测出 41 个潜在药效活性成分,1 775 条靶点信息,见表 2。

3.5 沙棘叶治疗高脂血症靶点的确定 共收集到 337 个沙棘叶有效成分作用靶点,“hyperlipidemia”疾病靶点 643 个,将沙棘叶作用靶点与“hyperlipidemia”疾病靶点取交集,得到两者交集靶点共 48 个,并形成韦恩图,见增强出版附加材料。

3.6 药物-疾病-靶点图的构建 将沙棘叶活性成分与沙棘叶成分靶点和高脂血症的交集靶点导入 Cytoscape 3.7.1 软件构建药物-活性成分-潜在靶点图,见增强出版附加材料。该网络共包括 91 个节点,321 条边。图中外圈黄色部分代表沙棘叶活性

3.3 细胞内 TG、TC 含量测定结果 经诱导剂诱导后,除空白组外,各组细胞的 TG 水平均有不同程度的提高,其中模型组 TG 和 TC 水平明显提高(P<0.05, P<0.01),而经过含药血清处理后,细胞内 TG 和 TC 水平又有显著下降(P<0.01)。见表 1。

成分靶点与高脂血症的交集靶点,内圈蓝色部分表示沙棘叶活性成分,中间红色表示高脂血症。Network Analyzer 功能分析显示该网络中 Degree 值排名前 10 的成分见表 3,这提示槲皮素、山柰酚、芹菜素等可能是沙棘叶潜在降脂成分。

3.7 PPI 网络的构建结果 通过 STRING 数据库分析 48 个映射得到的交集靶点,将数据进行分析之后导入 Cytoscape 3.7.1 软件,构建预测沙棘叶治疗高脂血症相关疾病靶点 PPI 网络,见增强出版附加材料,图中颜色越深,面积越大表示靶点 degree 值越大,在网络中越重要。该网络共有 48 个节点,259 条边,用软件自带的 Network Analysis 插件进行网络拓扑分析,介度中心性(BC)平均值为 0.021,紧密中心性(CC)平均值为 0.517,degree 值平均值为 10.792。利用 CytoHubba 插件取 degree 值前 10 为该网络的

表2 沙棘叶41个潜在活性成分的具体信息

Table 2 Specific information of 41 potential active components in Hippophae Folium

成分	英文名称	靶点数目/个	GeneSymbol数目/个	成分	英文名称	靶点数目/个	GeneSymbol数目/个
山柰酚	kaempferol	100	104	原儿茶酸	protocatechuic acid	26	26
芹菜素	apigenin	100	104	4-羟基苯甲酸	4-hydroxybenzoic acid	24	24
槲皮素	quercetin	100	104	咖啡酸	caffeic acid	50	50
异鼠李素	isorhamnetin	99	103	羟基肉桂酸	hydroxycinnamic acid	17	17
表儿茶素	(-)-epicatechin	15	15	原儿茶酸乙酯	protocatechuic ethyl ester	58	66
表没食子儿茶素	(-)-epigallocatechin	15	15	芥子酸	sinapic acid	80	80
没食子儿茶素	(-)-gallocatechin	15	15	鞣花酸	ellagic acid	57	63
表儿茶素	EC	15	15	p-香豆酸	p-cumaric	29	29
杨梅素	myricetin			阿魏酸	ferulic acid	11	11
木犀草素	luteolin	100	104	丙氨酸	d-alanine	1	1
花青素	cyanidin chloride	100	104	蛋氨酸	l-methionine	28	28
表儿茶素没食子酸酯	(-)-epicatechin gallate	44	46	谷氨酸	l-glutamic acid	58	65
熊果醛	ursolic aldehyde	83	84	精氨酸	argininic acid	1	1
熊果酸	ursolic acid	78	80	苯丙氨酸	phenylalanine	35	36
胆固醇	cholesterol	44	44	赖氨酸	l-lysine	25	25
羽扇豆醇	lupeol	26	27	脯氨酸	proline	11	16
钝叶醇	obtusifoliol	62	62	苏氨酸	dl-threonine	2	2
β-谷甾醇乙酸酯	β-sitosterol acetate	35	36	天冬氨酸	aspartic acid	1	1
Δ7-豆甾烯醇乙酸酯	delta(7)-stigmastenol	57	58	缬氨酸	l-valine	11	18
没食子酸	gallic acid	25	25	异亮氨酸	l-isoleucine	30	33
丁香酸	syringic acid	34	34				

表3 药物-疾病-靶点图中 degree值排名前10的靶点

Table 3 Top 10 targets with degree value in "drug disease target" diagram

成分	degree值
山柰酚(kaempferol)	104
芹菜素(apigenin)	102
槲皮素(quercetin)	101
异鼠李素(isorhamnetin)	101
杨梅素(myricetin)	101
木犀草素(luteolin)	101
花青素(cyanidin chloride)	84
熊果醛(ursolic aldehyde)	81
芥子酸(sinapic acid)	79
熊果酸(ursolic acid)	63

核心靶点,见增强出版附加材料。经过Cytoscape软件中的Network Analyzer功能分析之后,按照Degree值排序最前的十个靶点信息分别为:血清白蛋白(ALB)、过氧化物酶体增殖物激活受体γ(PPARγ)、丝裂原活化蛋白激酶3(MAPK3)、表皮生

长因子受体(EGFR)、雌激素受体α(ESR1)、凝血酶(F2)、基质金属蛋白酶(MMP)-9、血管紧张素转换酶(ACE)、雄激素受体(AR),上述靶点蛋白在网络中十分重要可能为沙棘叶治疗高脂血症的核心靶点。

3.8 GO富集分析和KEGG通路富集分析结果

3.8.1 GO富集分析 GO功能富集分析全称“Gene Ontology”,主要包括3个方面,即分子功能(MF),生物过程(BP)和细胞组成(CC)。将整理好的沙棘叶成分与高脂血症的交集靶点利用R4.1.0中的“scRNA.GO”程序整合富集并进行可视化。结果见增强出版附加材料。沙棘叶治疗高脂血症的生物过程主要集中于调节胆固醇储存、调节脂质代谢过程、胆固醇储存、负调节胆固醇储存、正调节脂质代谢过程等;涉及到的细胞组要包括囊腔、分泌颗粒腔、细胞质囊腔;分子功能则包括核受体活性、配体激活转录因子活性、类固醇结合等。

3.8.2 KEGG通路富集分析及“成分-靶点-通路”网络图构建 KEGG富集结果显示,主要信号通路有

47条,将P排名前20的KEGG通路结果绘制气泡图,主要涉及到PPAR信号通路、胰岛素抵抗、AMP活化蛋白激酶(AMPK)信号通路、缺氧诱导因子(HIF)-1信号通路等,将P排名前10的通路与沙棘叶活性成分和交集靶点绘制成“成分-靶点-通路”图,见增强出版附加材料。

4 讨论

高脂血症是一种常见而多发的人体机体脂肪代谢异常的疾病,属于现代医学范畴,一般伴有高TC、高TG、高LDL水平,也是多种心血管疾病的常见症状,被称为“万病之首”^[11]。中医认为高脂血症的病因主要在于先天不足和后天失养。《黄帝内经·素问·经脉别论》中记载:“饮入于胃,游溢精气,上输于脾,脾气散精,上归于肺,通调水道,下输膀胱,水精四布,五经并行”,脾主运化水谷,脾失健运,水谷运化不利,反化为浊,阻滞气机。肝藏血,主疏泄,调畅气机,肝虚则气机不畅,血行不畅,痰浊湿阻内生,导致血脂异常。肾为先天之本,主纳气,主水液运行,肾虚则其病机属于本虚标实的范畴^[12]。

近年来有很多研究证实,沙棘叶子中同样含有丰富的活性物质^[13-15]。2013年,国家卫生和计划生育委员会公告(第7号)将沙棘叶列为新资源食品。沙棘叶提取物对高脂血症的治疗作用也经过多次体内实验予以证实^[15-17],但是并未进行体外实验验证,实验药物大多数为沙棘叶的提取物,尚无法全面验证沙棘叶对高脂血症的治疗作用;本实验将沙棘叶制备成含药血清,对经过高脂诱导的HepG2细胞进行干预,结果表明经过沙棘叶含药血清干预后的细胞脂质沉积情况有所减轻,细胞内的TG、TC水平也显著下降,这也在体外实验的层面上验证了沙棘叶具有良好的降血脂作用。

网络药理学结果显示,沙棘叶治疗高脂血症的主要活性成分可能为槲皮素、山柰酚、异鼠李素、芹菜素等;潜在核心靶点为PPAR γ 、ALB、MMP-9等;主要富集于PPAR信号通路、HIF-1信号通路、胰岛素抵抗等通路。沙棘叶中含有的主要活性成分主要为黄酮类成分^[4],黄酮类成分具有良好的降脂作用,动物实验结果也表明沙棘叶黄酮可显著降低高脂血症大鼠和小鼠的血脂水平^[16-17],山柰酚具有抗癌、抗氧化、抗炎、保肝等作用^[18]。DABEEK等^[19]研究发现山柰酚具有良好的降压和保护心血管的功能。YAMAMOTO等^[20]研究发现山柰酚能有效降低高脂血症大鼠的血浆脂质水平并降低心血管疾病的风险。槲皮素具有显著的降脂减肥的作用,郭

艳芳等^[21]研究发现槲皮素可明显改善糖尿病大鼠糖脂代谢紊乱,降低大鼠体内总胆固醇含量。孙奔等^[22]发现槲皮素可调节膳食营养脂质吸收、抑制葡萄糖转运、调节血浆中的TG水平来达到其降脂的作用。芹菜素也具有良好的降脂作用,KIM等^[23]研究发现芹菜素可下调早期成脂转录因子C/EBP β 、PPAR γ 和C/EBP α 的表达,上调多种C/EBP β 抑制剂的表达,抑制脂肪细胞的生成。

沙棘叶治疗高脂血症与脂质代谢相关的主要为PPAR信号通路,脂肪酸结合蛋白(FABP)作用于肝脏骨骼肌及其内的脂肪细胞,进而激发过氧化物酶体增殖物激活受体家族的蛋白(PPAR α 、PPAR γ 、PPAR β),这些蛋白进一步激活酮体生成、脂质转运、脂质生成、胆固醇生成等各种途径,从而发挥与脂质代谢相关的脂肪酸转运、胆汁酸生物合成、葡萄糖转运等多种生物功能^[24-25]。

高脂血症实验模型近年来主要集中于兔子、大鼠、小鼠、豚鼠等与人类遗传基因较为相似的动物模型^[26],但是这些动物模型造模时间较长,成本较高,因动物之间存在的个体差异较大,难免会对实验结果产生误差,人肝癌细胞株HepG2因其细胞具有分化程度高,生长周期短,稳定性好等优势,近年来成为体外降脂实验常用的模型之一^[27],因此本实验采取HepG2细胞构建高脂细胞模型,进行药效物质基础研究的同时也采用网络药理学对沙棘叶治疗高脂血症的作用机制和有关降脂成分进行预测,尚需进一步实验验证,下一步研究工作的重点则在于验证沙棘叶降脂成分并从基因、蛋白表达等层面对PPAR信号通路加以验证,以期对沙棘叶治疗高脂血症的作用机制进一步探究。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] EL-TANTAWY W H, TEMRAZ A. Natural products for controlling hyperlipidemia: Review [J]. Arch Physiol Biochem, 2019, 125(2): 128-135.
- [2] YAO Y S, LI T D, ZENG Z H. Mechanisms underlying direct actions of hyperlipidemia on myocardium: An updated review [J]. Lipids Health Dis, 2020, 19(1): 23.
- [3] 冉贝贝, 李卫东. 沙棘果与沙棘叶化学成分及其差异的研究进展[J]. 中国中药杂志, 2019, 44(9): 1767-1773.
- [4] 高峰, 郭延丽, 刘巧, 等. 沙棘叶子研究利用综述[J]. 安徽农业科学, 2020, 48(10): 7-11.

- [5] 李月,刘青,王悦,等. 沙棘叶的应用及现代研究进展[J]. 中国中药杂志, 2021, 46(6): 1326-1332.
- [6] 尼亚孜·乌吉艾合买提,刘续元,阿卜来海提·阿卜杜瓦伊提,等. 沙棘不同部位化学成分和药理作用研究概况[J]. 中国民族民间医药, 2020, 29(12): 72-76.
- [7] 杨志刚,郑文惠,张凯雪,等. 沙棘叶中鞣质类成分及其抗炎和抗肥胖活性研究[J]. 中草药, 2019, 50(12): 2809-2816.
- [8] ZHANG R, ZHU X, BAI H, et al. Network pharmacology databases for traditional Chinese medicine: Review and assessment [J]. Front Pharmacol, 2019, 10: 123.
- [9] 刘建文. 药理实验方法学[M]. 北京: 化学工业出版社, 2008.
- [10] 董军,李健斋. 血清胆固醇测定方法及标准化问题(卫生部北京老年医学研究所生化室研究工作回顾)[J]. 中华医学检验杂志, 1998, 21(1): 16-18.
- [11] 杨雪,万茜淋,杨阳,等. 传统中药及成方制剂防治高脂血症的研究进展[J]. 慢性病学杂志, 2020, 21(12): 1811-1815.
- [12] 张隐庵. 黄帝内经素问集注[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1959. .
- [13] 闫昌誉,余桂媛,贺晓静,等. 沙棘叶的研究进展与产业化应用[J]. 今日药学, 2021, 31(7): 481-492.
- [14] 武海丽,杜锦娥,路洋洋,等. 沙棘叶多酚的分离纯化及其活性分析[J]. 山西大学学报: 自然科学版, 2021, doi: 10. 13451/j. sxu. ns. 2021090.
- [15] 冉丽梅,周鸿立,刘宇琦,等. 吉林地区沙棘红茶活性成分及抗氧化活性的研究[J]. 吉林化工学院学报, 2021, 38(9): 5-8, 52.
- [16] 孙天宇. 沙棘叶黄酮的提取分离及降血脂作用小鼠试验的研究[D]. 大庆: 黑龙江八一农垦大学, 2012.
- [17] 魏志成,左芳,童东,等. 沙棘叶总黄酮胶囊对实验性高脂血症大鼠的影响[J]. 中药与临床, 2016, 7(4): 33-34, 41.
- [18] 雷晓青,陈鳌,刘毅,等. 山茶酚药理作用的研究进展[J]. 微量元素与健康研究, 2017, 34(2): 61-62.
- [19] DABEEK W M, MARRA M V. Dietary quercetin and kaempferol: Bioavailability and potential cardiovascular-related bioactivity in humans [J]. Nutrients, 2019, 11(10): 31557798.
- [20] YAMAMOTO Y, YASUOKA A. Welsh onion attenuates hyperlipidemia in rats fed on high-fat high-sucrose diet[J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2010, 74(2): 402-404.
- [21] 郭艳芳,张皓,朱玲,等. 槲皮素改善糖尿病肥胖大鼠糖脂代谢紊乱及总胆固醇的作用[J]. 解剖学研究, 2018, 40(6): 505-509.
- [22] 孙卉,滕浩,杜密英,等. 槲皮素降脂减肥机制研究进展[J]. 食品工业科技, 2019, 40(16): 349-353, 362.
- [23] KIM M A, KANG K, LEE H J, et al. Apigenin isolated from *Daphne genkwa* Siebold et Zucc. inhibits 3T3-L1 preadipocyte differentiation through a modulation of mitotic clonal expansion[J]. Life Sci, 2014, 101(1/2): 64-72.
- [24] MARION-LETELLIER R, SAVOYE G, GHOSH S. Fatty acids, eicosanoids and PPAR gamma[J]. Eur J Pharmacol, 2016, 785: 44-49.
- [25] PRASHANTHA KUMAR B R, KUMAR A P, JOSE J A, et al. Minutes of PPAR- γ agonism and neuroprotection [J]. Neurochem Int, 2020, 140: 104814.
- [26] 高婷,苗明三. 基于数据挖掘的高脂血症动物模型分析[J]. 中药药理与临床, 2022, doi: 10. 13412/j. cnki. zyyl. 20210806. 003.
- [27] JAVITT N B. HepG2 cells as a resource for metabolic studies: lipoprotein, cholesterol, and bile acids [J]. FASEB J, 1990, 4(2): 161-168.

[责任编辑 顾雪竹]