



食品工业科技

SCIENCE AND TECHNOLOGY OF FOOD INDUSTRY

半月刊

权威 · 核心 · 领先 · 实用 · 全面

美国《化学文摘》CA

日本科学技术振兴机构数据库JST

北大核心期刊

中国生物医学文献系统SinoMed收录期刊

中国精品科技期刊

英国《食品科技文摘》FSTA

中国科技核心期刊CSTPCD

RCCSE中国核心学术期刊

中国农林核心期刊A

基于网络药理学探讨山楂叶抗高脂血症的作用机制及初步验证

刘学贵, 李志明, 刘长风, 周静瑶, 王瑶瑶, 高品一, 李丹琦

Mechanism of Action of Hawthorn Leaves against Hyperlipidemia Based on Network Pharmacology and Preliminary Validation Study

LIU Xuegui, LI Zhiming, LIU Changfeng, ZHOU Jingyao, WANG Yaoyao, GAO Pinyi, and LI Danqi

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2021100176>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

基于网络药理学与分子对接技术探讨益肝草凉茶解酒保肝的作用机制

Mechanism of Relieving Alcohol and Protecting Liver of Yigancao Herbal Tea Based on Network Pharmacology and Molecular Docking Technology

食品工业科技. 2021, 42(8): 8-18

基于体外药效学结合网络药理学和分子对接对人参-桑椹改善骨质疏松的机制研究

Mechanism of Ginseng-Mulberry Treating Osteoporosis Based on Pharmacodynamics *in Vitro* Combined with Network Pharmacology and Molecular Docking

食品工业科技. 2021, 42(20): 1-13

基于网络药理学探讨桦褐孔菌降血糖功效成分及作用机制

Action Mechanism of *Inonotus obliquus* in the Treatment of Diabetes and the Material Basis of Pharmacodynamics Based on Network Pharmacology

食品工业科技. 2021, 42(22): 18-29

基于网络药理学探讨预知子抗抑郁的作用机制

Mechanism of Anti-depression Mechanism of Akebiae Fructus Based on Network Pharmacology

食品工业科技. 2021, 42(14): 8-15

基于网络药理学分析咖啡酰奎宁酸类化合物治疗II型糖尿病的作用机制

Mechanism of Caffeoylquinic Acids in the Treatment of Type II Diabetes Based on Network Pharmacology

食品工业科技. 2021, 42(14): 16-24

基于网络药理学分析金钗石斛治疗神经系统疾病的药效物质基础及作用机制

Analysis of the Pharmacodynamic Material Basis and Mechanism of Dendrobium Nobile in the Treatment of Nervous System Diseases Using Integrative Network Pharmacology

食品工业科技. 2021, 42(13): 1-10



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

刘学贵, 李知明, 刘长风, 等. 基于网络药理学探讨山楂叶抗高脂血症的作用机制及初步验证 [J]. 食品工业科技, 2022, 43(12): 36-45. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021100176

LIU Xuegui, LI Zhiming, LIU Changfeng, et al. Mechanism of Action of Hawthorn Leaves against Hyperlipidemia Based on Network Pharmacology and Preliminary Validation Study[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(12): 36-45. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021100176

· 未来食品 ·

基于网络药理学探讨山楂叶抗高脂血症的作用机制及初步验证

刘学贵^{1,2}, 李知明³, 刘长风⁴, 周静瑶³, 王瑶瑶³, 高品一^{3,*}, 李丹琦^{1,5,*}

- (1.沈阳化工大学功能分子研究所, 辽宁沈阳 110142;
- 2.硼镁资源开发与精细化工技术国家地方联合工程实验室, 辽宁沈阳 110142;
- 3.沈阳化工大学制药与生物工程学院, 辽宁沈阳 110142;
- 4.沈阳化工大学环境与安全工程学院, 辽宁沈阳 110142;
- 5.辽宁省绿色功能分子设计与开发重点实验室, 辽宁沈阳 110142)

摘要:目的: 利用网络药理学预测山楂叶中治疗高脂血症的潜在化合物、靶点及作用通路, 采用靶酶和细胞实验对网络药理学的预测结果进行初步验证, 为深入探讨山楂叶抗高脂血症的物质基础及其作用机制提供了依据。方法: 通过中药系统药理学数据库分析平台和文献挖掘获得山楂叶的化学成分, 利用相关数据库获得潜在靶点, 对其进行 GO 和 KEGG 分析, 构建“成分-靶点-通路”网络。通过 ERK2 激酶、油红 O 染色以及甘油三酯实验, 对网络药理学预测的有效成分及潜在靶点进行了验证。结果: 基于网络药理学方法, 得到山楂叶的活性成分 93 个, 相互作用的靶点蛋白 40 个, 山楂叶化学成分对高脂血症的治疗作用主要是通过如下信号通路: 代谢通路、AMPK 信号通路、HIF-1 信号通路、胰岛素抵抗、甲状腺激素信号通路; 根据网络药理学预测结果, 结合课题组分离得到的山楂叶代表性化合物, 对牡荆素等 6 个化合物进行 ERK2 激酶活性测试, 结果显示牡荆素对 ERK2 激酶的抑制率最高达到 84%; 通过构建高脂 HepG2 细胞模型, 进行了油红 O 染色及定量实验, 测定了 TG 含量, 发现经牡荆素干预后, 细胞内脂滴数量随牡荆素浓度增加而逐渐减少, 且 TG 含量有所下降, 说明牡荆素能降低细胞中的脂质积累及 TG 含量, 进而验证了网络药理学预测山楂叶中化合物牡荆素抗高脂血症的结果。结论: 本文运用网络药理学预测了山楂叶中化合物抗高脂血症的物质基础和作用机制, 靶酶、油红 O 染色和 TG 定量实验初步证实了网络药理学的预测结果, 同时提示牡荆素有望作为一种降低细胞内血脂含量的潜在治疗化合物。

关键词: 网络药理学, 山楂叶, 高脂血症, 分子对接, 油红 O 染色

中图分类号: R285

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2022)12-0036-10

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2021100176

本文网刊:



Mechanism of Action of Hawthorn Leaves against Hyperlipidemia Based on Network Pharmacology and Preliminary Validation Study

LIU Xuegui^{1,2}, LI Zhiming³, LIU Changfeng⁴, ZHOU Jingyao³, WANG Yaoyao³, GAO Pinyi^{3,*}, LI Danqi^{1,5,*}

- (1. Institute of Functional Molecules, Shenyang University of Chemical Technology, Shenyang 110142, China;
2. National-Local Joint Engineering Laboratory for Development of Boron and Magnesium Resources and Fine Chemical Technology, Shenyang University of Chemical Technology, Shenyang 110142, China;
3. College of Pharmaceutical and Biological Engineering, Shenyang University of Chemical Technology, Shenyang 110142, China;

收稿日期: 2021-10-18

基金项目: 辽宁省教育厅服务地方项目 (LZ2020001); 辽宁省教育厅基础研究基金项 (LJ2020026); 辽宁省科技厅面上项目 (2021-MS-258); 辽宁省教育厅基础研究基金项 (LQ2019010)。

作者简介: 刘学贵 (1972-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 天然产物中生物活性成分功能性研究, E-mail: liuxuegui@syuct.edu.cn。

*** 通信作者:** 高品一 (1981-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 天然药物化学, E-mail: gpy1981@163.com。

李丹琦 (1987-), 女, 博士, 讲师, 研究方向: 天然产物结构鉴定与相关药理活性研究, E-mail: lidanqi@yeah.net。

4.College of Environment and Safety Engineering, Shenyang University of
Chemical Technology, Shenyang 110142, China;

5.Liaoning Province Key Laboratory of Green Functional Molecular Design and Development, Shenyang University of
Chemical Technology, Shenyang 110142, China)

Abstract: Objective: Network pharmacology was used to predict potential compounds, targets and pathways of action in hawthorn leaves for the treatment of hyperlipidaemia, and the network pharmacology predictions were validated in conjunction with target enzyme and cellular assays. The material basis and mechanism of action of hawthorn leaves against hyperlipidemia. Methods: The chemical components of hawthorn leaves were obtained through the traditional Chinese Medicine System Pharmacology database analysis platform and literature mining, and the potential targets were obtained by using the relevant databases. GO and KEGG analysis were carried out to construct the “component-target-pathway” network. The effective components and potential targets predicted by network pharmacology were verified by ERK2 kinase, oil red O staining and triglyceride experiment. Results: After the network pharmacology screening, 96 active ingredients and 40 interacting target proteins were obtained from hawthorn leaves. The results of KEGG analysis indicated that the therapeutic effects of the active ingredient on hyperlipidaemia were mainly through the following signalling pathways: Metabolic pathway, AMPK signaling pathway, HIF-1 signaling pathway, insulin resistance, thyroid hormone signaling pathway. According to the prediction results of network pharmacology, combined with the representative compounds of hawthorn leaves isolated by the research group, the ERK2 kinase activity of six compounds such as vitexin was tested. The results showed that the inhibition rate of vitexin on ERK2 kinase was the highest, reaching 84%. By constructing high-fat HepG2 cell model, oil red O staining and quantitative experiment were carried out, and TG content was measured. It was found that after vitexin intervention, the number of lipid droplets in cells gradually decreased with the increasing of vitexin concentration, and TG content decreased, indicating that vitexin could reduce lipid accumulation and TG content in cells. Further, the results of network pharmacology predicted the anti hyperlipidemia effect of vitexin in hawthorn leaves were verified. Conclusion: In this paper, network pharmacology was used to predict the material basis and mechanism of action of compounds in hawthorn leaves against hyperlipidemia. Target enzyme, oil red O staining and TG quantification experiments initially confirmed the network pharmacology predictions, while suggesting that vitexin would be promising as a potential therapeutic compound for reducing intracellular lipid content.

Key words: network pharmacology; hawthorn leaves; hyperlipidaemia; molecular docking; oil red O staining

高脂血症(hyperlipidaemia, HLP)是由本身血脂代谢异常而引起的疾病,常表现为血清高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)降低或总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)升高^[1]。高脂血症不仅仅是肥胖和 2 型糖尿病等疾病的致病因素,还与高血压、脂肪肝、动脉粥样硬化等代谢型疾病密切相关^[2]。目前,高脂血症的治疗药物以西药辛伐他汀、普伐他汀、非诺贝特、氯贝特等为主^[3-4],这类药物具有明确效果,但靶点单一,长期使用常伴有副作用,如胃肠道不良反应、肝肾功能损害等,并且停药后反弹几率高^[5]。因此,植源性药物的研究成为人们关注的热点^[6]。相关研究发现许多天然产物中的黄酮类和皂苷类等化学成分能够对肝脏脂质代谢系统进行调节,从而达到降血脂的目的^[7]。

山楂(*Crataegus pinnatifida* Bunge),又名山里红,蔷薇科山楂属,落叶乔木。山楂具有降血脂、血压、强心、抗心律不齐等作用^[8]。大多数山楂属植物具有深绿色的叶子,白色的花和深红色的果实^[8]。山楂叶是山里红的干叶,三角卵形或宽卵形,无毛,锯齿在边缘处,具有 3~7 片裂片,味涩,微苦^[9-11]。山楂叶作为药用植物有着悠久的历史,其已用于癌症、心血管疾病和糖尿病的治疗^[12-16]。刁婷婷等^[17]以高脂血症大鼠为研究对象,发现经过山楂叶总黄酮灌胃处理

的大鼠肝脏组织中的(AMPK)表达增加,脂肪酸合成速度减缓,脂质代谢能力加强,并且脂肪变性程度有所减轻。肖峰等^[18]研究发现,山楂叶总黄酮可以调节血脂水平,降低游离脂肪酸含量,进而起到抗炎抗氧化损伤的作用。

网络药理学是一个综合性的概念,是在当前环境下将网络生物学、化学生物学和系统生物学相互结合而衍生出来的一门新兴学科。2007 年英国科学家 Hopkins 为了研究多组分药物之间的协同性和规律性,以寻找低毒性和高效性的药物,提出了网络药理学这一概念^[19]。网络药理学主要是通过网络构建、网络分析和实验验证的方式将网络信号靶点和传统实验相结合,不但为寻找中药和方剂的作用机制提供了新的方法,而且还可以加快药物的研发进程^[20]。本文运用网络药理学的方法,探究了山楂叶有效成分对高脂血症疾病网络的作用机制,进而预测出山楂叶中抗高脂血症的良好化合物以及对应的靶点蛋白,为山楂叶中活性化合物的开发与利用提供支持。

1 材料方法

1.1 材料与仪器

荳蔻苷 阿拉丁生化科技股份有限公司;齐墩果酸、毛蕊花糖苷、芦丁、牡荆素、4% 多聚甲醛、油酸、异丙醇、阿托伐他汀 上海麦克林生化科技有限

公司;牡荆素-2"-O-鼠李糖 由作者课题组分离、纯化和制备得到;ERK2 激酶 日本 Carina 公司;Staurosporine(星形孢菌素) 美国 Med Chem Express 公司;DMSO、MgCl₂、DTT、Triton X-100、Brij-35、ATP 美国 Sigma 公司;Peptide 8 岛津 GL 公司;HEPES、EDTA、10% 胎牛血清 澳洲 Gibco 公司;人体肝癌 HepG2 细胞株 上海富衡生物科技有限公司;MEM 培养基、胰蛋白酶 美国 Hyclone 公司;油红 O 染液、苏木素染液、PBS 缓冲液、甘油三酯(TG)试剂盒、BCA 蛋白测定试剂盒 南京建成科技有限公司;4% 组织细胞固定液 北京索莱宝科技有限公司。

CLM-170B-8-NF 酶标仪、二氧化碳恒温培养箱 美国 Thermo 公司;TS-1 恒温培养摇床 上海一恒科学仪器有限公司;AE31E 倒置显微镜 美国 Motic 公司;BS 224 S 电子分析天平 瑞士梅特勒托利多公司;HH-ZK2 恒温水浴锅 郑州予仪器制造有限公司;TGL-16 医用离心机 湘仪集团;LX-B35 L 自动电热压力蒸汽灭菌器 华泰医疗设备有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 化合物的收集和结构处理 经过对山楂叶化学成分文献的调研和本实验组前期工作,共整理出 116 个以黄酮类化合物为主的化合物^[21-27],使用 Chem Biodraw Ultra 14.0 软件绘制其化学结构,并以 MOL2 格式进行保存。

1.2.2 高脂血症潜在靶点的收集 以“Hyperlipidemia”、“Hyperlipemia”、“High cholesterol”等为关键词,利用 GeneCards 数据库、Therapeutic Target Database、DrugBank 以及 Uniprot 数据库进行检索,查找筛选出 40 个分辨率不高于 3.0 Å 且拥有原始配体的人源靶点蛋白。

1.2.3 “化合物-靶点”网络的构建 利用 Sybyl-X (version 2.0, Tripos, Inc.)对靶点蛋白进行修饰,将修饰好的蛋白和保存好的 MOL2 格式的化合物进行半柔性分子对接,将对接得分大于 8 的化合物和靶点蛋白共同导入 Excel 表格,利用 Cytoscape v3.7.1 软件构建化合物-靶点蛋白网络。

1.2.4 蛋白相互作用网络的构建 将 1.2.3 得到的山楂叶活性成分和高脂血症交集的靶点导入到 STRING 数据库,种群定义为人类,最小交互阈值设置为 0.4,其他参数默认。将得到的结果导入 Cytoscape v3.7.1 软件中,生成 PPI 网络。

1.2.5 GO 生物过程和 KEGG 信号通路富集分析 将需要分析的基因提交到 DAVID 平台中,选定人的全基因作为背景,对疾病的相关靶点进行 GO 和 KEGG 富集分析,得到生物过程、细胞成分、分子功能和关键信号通路的富集信息,利用 R 软件对富集 P 值小于 0.05 的功能进一步分析。

1.2.6 “化合物-靶点-信号通路”构建 将化合物、信号通路和靶点之间的联系利用 Cytoscape v3.7.1 软

件建立,即构建化合物-靶点-信号通路网络以识别他们之间的关系。网络特征分析由软件中的“network analyzer”程序完成以此来初步得出化合物与靶点蛋白之间的作用情况和靶点蛋白在相关通路之间的联系。

1.2.7 ERK2 激酶抑制活性实验 丝裂原活化蛋白激酶 MAPK,是一组高度保守的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,包括细胞外信号调节激酶(ERK)、c-Jun 氨基端激酶(JNK)、p38MAPK、ERK5^[28],MAPK 的激活是脂肪形成的重要组成部分^[29]。ERK 是 MAPK 主要的通路之一,位于 MAPK 通路的下游,MAPK 的所有突变和扩增最终都会导致 ERK 的异常激活^[30-31]。细胞中脂滴的形成依赖于 ERK2 的激活,抑制 ERK2 能显著降低 VLDL 脂解后的脂滴积累^[32]。同时,一些体内实验表明一些促脂肪剂抑制 MEK/ERK 活性可以阻止脂肪细胞的生成,降低体内整体血脂水平以治疗高脂血症^[33]。因此,抑制 ERK2 被认为是治疗高脂血症的潜在途径。

本文以 ERK2 为靶酶,STS(星形孢菌素)为阳性对照药,基于网络药理学的预测结果,结合实验组前期从山楂叶中分离得到的代表性和量大的化合物,选取 6 个(牡荆素、齐墩果酸、毛蕊花糖苷、芦丁、荜草苷、牡荆素-2-O 鼠李糖苷)委托上海睿智化学研究有限公司采用迁移率改变法^[34]进行活性验证实验:

制备激酶液(50 mmol/L HEPES, pH7.5, 0.01% Triton X-100)和停止液(100 mmol/L HEPES, pH7.5, 0.015% Brij-35, 0.2 % 涂层试剂 #3, 50 mmol/L EDTA)。

将待测化合物在 DMSO 中制备成 10 mmol/L 的储备液。随后再用 DMSO 稀释至 5000 μmol/L。取 100 μL,添加到 96 孔板中。利用梯度稀释的方法将化合物配制成 100、10 μmol/L 和 1 μmol/L 的稀释液。

取 5 μL 的稀释液加入到混合有 10 μL DMSO 和 90 μL 的 1×激酶缓冲液的检测板中。在 1×激酶缓冲液中加入激酶,配成 2.5×酶溶液。在检测板上每孔加入 10 μL 2.5×酶液,在室温条件下孵育 10 min。孵育完成后向每个孔中加入 10 μL 的 2.5×肽溶液(在 1×激酶缓冲液中含有 FAM 标记的肽、ATP 以及 MgCl₂ 的肽溶液)以开始反应,并在 28 °C 的环境中孵育 30 min。加入 25 μL 停止液,反应结束。

使用 EZ Reader II (Caliper Life Sciences, Waltham, MA, USA)(下游电压-500 V,上游电压-2250 V,基础压力-0.5 PSI,屏幕压力-1.2 PSI)对所有样品进行分析,以读取转换值,抑制率百分比如式 1 所示。

$$\text{抑制率}(\%) = (\max - \text{conversion}) / (\max - \min) \times 100$$

式(1)

注: max 代表 DMSO 对照的转换值; min 代表无酶对照的转换值; conversion 代表给定化合物剂量下的转换值。

1.2.8 分子对接 本文利用 Auto Dock vina 1.1.2 软

件基于 ubuntu 20.04 系统进行对接。蛋白被设定一个分子口袋后,小分子以半柔性对接的方式与其对接。对接完成后对小分子和蛋白之间的结合能力进行打分。根据得分高低判断其相互作用力。

本文将阳性对照药(STS)、牡荆素、齐墩果酸、芦丁、荜苈子、牡荆素-2 O 鼠李糖苷和毛蕊花糖苷分别与 ERK2(4QTA)对接。

1.2.9 高脂 HepG2 细胞模型建立与甘油三酯含量测定 作为检测组织内油脂的常用试剂,油红 O 能够使脂肪组织及细胞内的脂滴着色^[35],而被广泛用于临床和科研病理的工作中^[36]。本文采用油红 O 对油酸处理的 HepG2 细胞进行染色。HepG2 细胞用含 10% 胎牛血清的培养液培养,并在培育箱中孵育。待生长密度达 80%~90% 时吸取 2 mL 的细胞接种于六孔板内(约 15 万个/孔),置于 37 ℃,5% 的 CO₂ 条件下培养 24 h,设置空白组、油酸模型组和药物处理组,如表 1 所示。

将六孔板中的培养液吸出,用 PBS 和 60% 异丙醇分别将细胞漂洗两次,避光条件下加入 1 mL 油红 O 染液,在 37 ℃ 恒温箱下保持 15 min,用 60% 异丙醇和蒸馏水分别进行漂洗,之后加入 0.5 mL 苏木素,复染 30 s。用显微镜观察,采集清晰图像,并用 100% 异丙醇提取染色脂滴,在 490 nm 处测定其吸光度。

有研究发现,阿托伐他汀(ATS,一类降低人体内胆固醇水平的药物)可以有效降低体内的血脂水平^[37]达到降血脂的目的。本文为检验牡荆素对脂质的抑制作用效果,在油酸存在的情况下,用 100 μmol/L 阿托伐他汀处理油酸组 HepG2 细胞作为阳性对照组,然后用油红 O 进行染色,在显微镜下观察,并在 490 nm 处测定其吸光度。另取一块培养条件相同的六孔板去除其上的培养液,用胰蛋白酶对细胞进行消化。然后在室温条件下,将细胞悬液放入离心机,以 1000 r/min 离心 10 min,去除上清液,将 0.5~1 mL 的 PBS 加入进细胞沉淀中混匀,重复操作 1~2 次,并在冰上加入裂解液进行裂解。裂解后按照说明书操作 TG 试剂盒,用酶标仪检测波长 510 nm 处的吸光度,用 BCA 试剂盒检测蛋白浓度,计算甘油三酯含量(如式 2 所示)。

甘油三酯含量(mmol/g prot) = (样品 - 空白)/(标准 - 空白) × 校准品浓度(mmol/L)/样本蛋白浓度(g prot/L)

式 (2)

2 结果与分析

2.1 有效成分-作用靶点网络图分析

通过网络药理学分析山楂叶中 116 个活性成分和 40 种高血脂症相关蛋白靶点的相互作用,分析结果表明山楂叶中有 93 种化合物分别与这 40 种高血脂症的蛋白可以相互结合。将对接得分大于 8 的化合物与蛋白汇总到 Excel 表格中并导入 Cytoscape v3.7.1 中(如图 1 所示)。整个网络以网络拓扑结构表示,其中正方形代表高血脂的靶点蛋白,圆形代表山楂叶中的活性化合物。通过 Network Analysis 分析,结果如下:该网络由 133 个节点和 441 条边组成,网络异构性为 1.167,网络密度为 0.050,网络的半径和直径分别为 4 和 6,网络中心度为 0.349,特征路径长度为 2.793,相邻平均数目为 6.632。其中,Erythro-1-(4-O-β-D-Glucopyranosyl-3-methoxyphenyl)-2-[4-(3-hydroxypropyl)-2,6-dimethoxyphenoxy]-1,3-propanediol(112)、Verbascoside(111)、(7S,8R)-5-Methoxydihydrodehydrodiconiferyl alcohol 4-O-β-D-glucopyranoside(113)、Acernikol-4"-O-β-D-glucopyranoside(107)、(2,3-Dihydro-2-(4-O-β-D-glucopyranosyl-3-methoxy-Phenyl)-3-hydroxymethyl-5-(3-hydroxypropyl)-7-methoxybenzofuran)(108)、Rutin(1)等为山楂叶抗高血脂症的潜在化合物,靶点蛋白 3V99(Arachidonate 5-lipoxygenase)、3WEG(Squa-

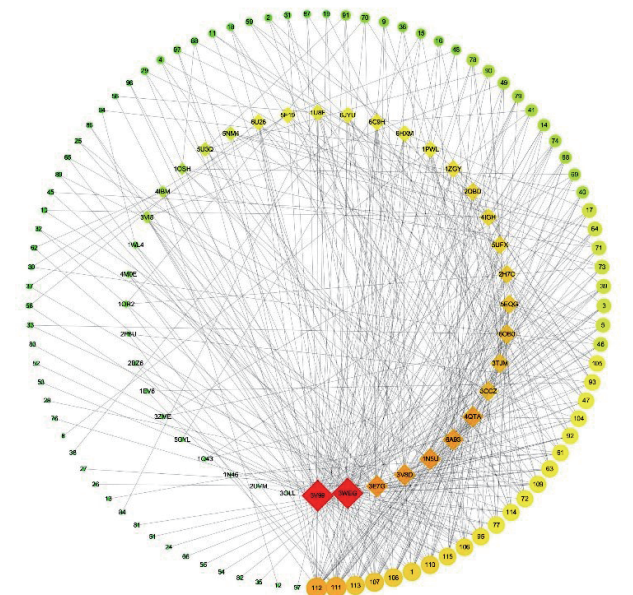


图 1 化合物-靶蛋白网络图
Fig.1 Network of compound-target protein

表 1 细胞加药方法

Table 1 Operation method of cell administration

组别		依次加入试剂	
空白组	细胞	给予相同体积培养液继续培养24 h	给予相同体积培养液继续培养24 h
油酸模型组	细胞	给予相同体积培养液继续培养24 h	加入油酸(100 μmol/L)2 mL/孔继续培养24 h
药物处理组 (25、50、100 μmol/L)	细胞	分别加入牡荆素(25、50、100 μmol/L) 2 mL/孔,培养24 h	分别加入牡荆素(25、50、100 μmol/L) 2 mL/孔,培养24 h

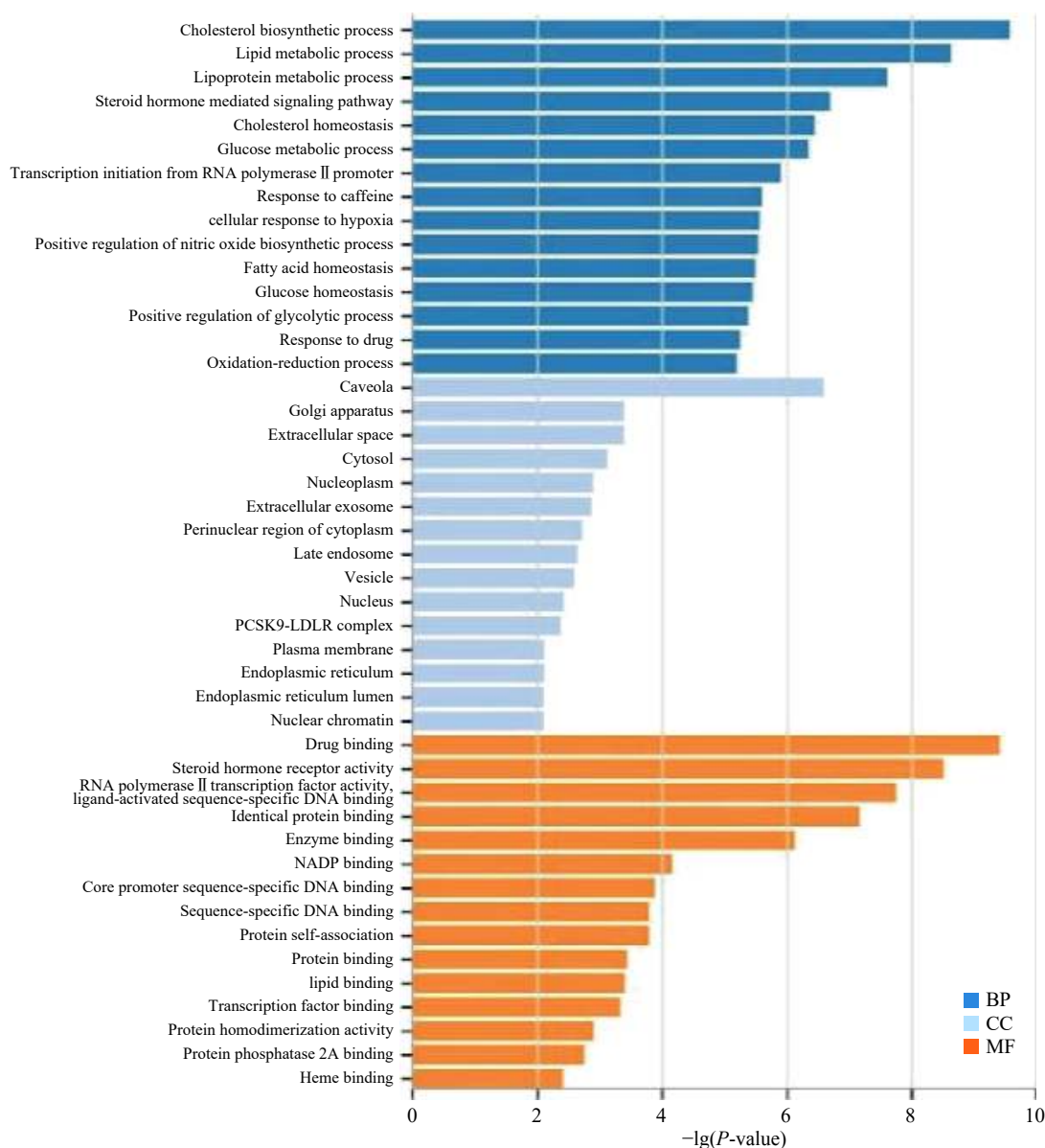


图3 靶蛋白的 GO 富集分析图

Fig.3 GO enrichment analysis of target proteins

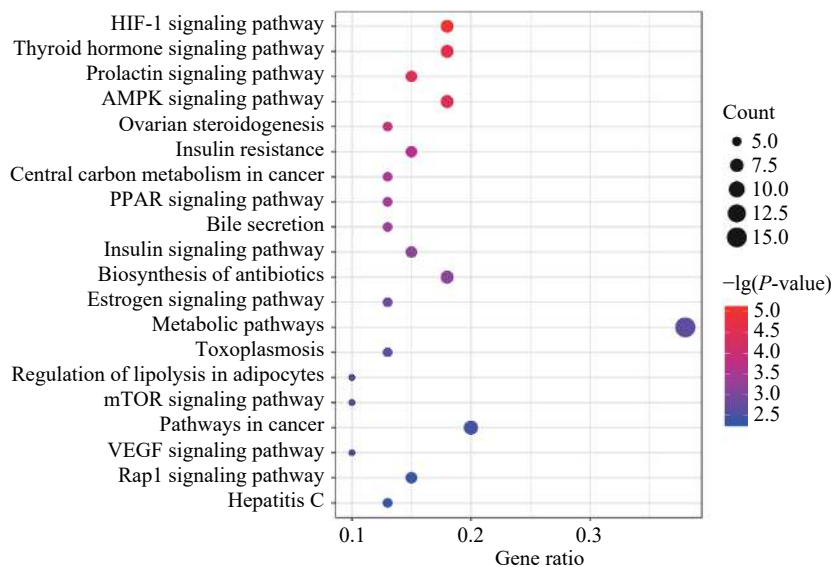


图4 高血脂症相关潜在靶点的 KEGG 分析图

Fig.4 KEGG analysis of potential targets related to hyperlipidaemia

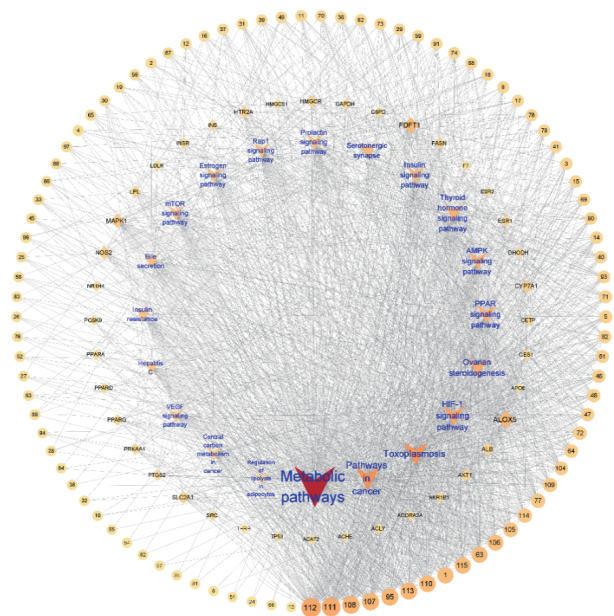


图5 化合物-靶点-信号通路网络图

Fig.5 Network of compound-target-signal pathway

FDFT1、MAPK1、NOS2、CYP7A1、ALB、HTR2A、SLC2A1、HMGCR、FASN, 关键信号通路为 Metabolic pathways、Pathways in cancer、Toxoplasmosis、HIF-1 signaling pathway、Ovarian steroidogenesis、PPAR signaling pathway、AMPK signaling pathway、Thyroid hormone signaling pathway、Insulin signaling pathway、Serotonergic synapse 等。

2.5 激酶验证试验结果

激酶实验结果如表2和图6所示。由表2和图6可知, 样品浓度和抑制率呈正相关关系。当化合物测试浓度为 100 $\mu\text{mol/L}$ 时, 牡荆素对 ERK2 抑制率最高为 84%, 牡荆素-2"-O-鼠李糖抑制率最弱, 抑制率仅为 3%。阳性对照药 IC_{50} 值为 0.470 $\mu\text{mol/L}$, 牡荆素 IC_{50} 值为 20.422 $\mu\text{mol/L}$, 其值虽高于阳性对照药, 但其仍表现出对 ERK2 激酶较好的抑制活性。所以, 可以认为牡荆素通过对 ERK2 的抑制以达到降血脂的目的。牡荆素是山楂叶中含量较高的代表性化合物, 有报道称其含量可达到 31.39%^[41], 由此, 表明在山楂叶抗高脂血症的过程中, 牡荆素可能通过与高脂血症的关键靶蛋白相互作用以达到降血脂的目的。

表2 化合物酶抑制活性测试结果

Table 2 Test results of enzyme inhibitory activity of the compounds

化合物在不同浓度下的抑制率(%)			
化合物	100 $\mu\text{mol/L}$	10 $\mu\text{mol/L}$	1 $\mu\text{mol/L}$
芦丁	30.7	3.9	1.3
牡荆素	84.0	19.1	-7.3
牡荆素-2"-O-鼠李糖	3.0	3	5.6
荭草苷	9.9	-3.0	-0.4
毛蕊花糖苷	-3.0	2.1	-19.3
齐墩果酸	70.8	-11.6	2.1

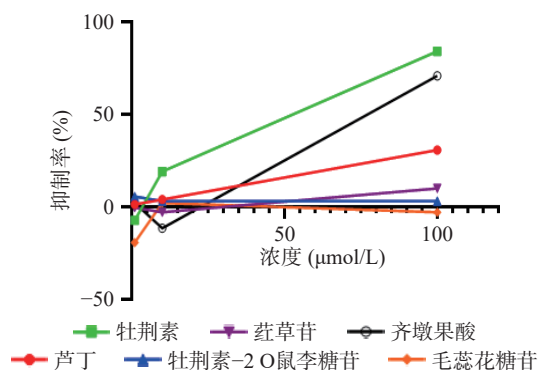


图6 化合物的 ERK2 激酶抑制活性

Fig.6 Inhibitory ERK2 kinase activity of the compounds

2.6 分子对接模式验证

本文利用分子对接模式来验证六种化合物和阳性对照药(STS)与靶点蛋白的结合能。分子对接的结合能越低, 说明配体与受体之间相互作用的可能就越大; 一般情况下, 当结合能小于 -5 kcal/mol 时代表两者之间具有良好的结合性^[42]。将阳性对照药(STS)、牡荆素、齐墩果酸、芦丁、荭草苷、牡荆素-2 O 鼠李糖苷和毛蕊花糖苷分别与 ERK2(4QTA)对接, 结合能分别为: -9.8、-9.6、-9.4、-8.8、-4.6、-3.9 和 -3.1 kcal/mol。将对接结果小于 -5 kcal/mol 的化合物进行分析, STS 与 ERK2 的 GLU-33、LYS-54、TYR-36 等残基结合(如图7A); 牡荆素与 LYS-54、SER-153、TYR-36 等残基结合(如图7D); 齐墩果酸与 SER-153、LYS-151、TYR-36 等残基结合(如图7B); 芦丁为与 LYS-151、SER-153、LYS-54 和 TYR-36 相互结合(如图7C)。

对接结果表明, 在实验组中牡荆素与 ERK2 的结合能最低, 所得实验结果与激酶实验测定的活性结果相一致。从另一角度验证了激酶活性实验结果的准确性。并且从对接结果可以推测, 残基 LYS-54 和 TYR-36 可是抑制 ERK2 激酶活性的主要残基。

2.7 油红 O 染色及定量试验结果

将处理后的细胞用油红 O 进行染色, 在显微镜下观察, 脂滴显示为鲜红色。并在 490 nm 处测定其吸光度。实验结果表明, 浓度为 100 $\mu\text{mol/L}$ 的阿托伐他汀可减少 12.2% 的脂滴堆积; 分别加入 100、50 $\mu\text{mol/L}$ 和 25 $\mu\text{mol/L}$ 的牡荆素后, 脂滴聚集分别减少 5.4%、2.2% 和 2.1%, 说明牡荆素对脂滴的聚集有一定的抑制作用, 且随着浓度增大, 抑制作用逐渐增强如图8和图9所示。

2.8 甘油三酯(TG)含量测试结果

牡荆素对高脂 HepG2 细胞甘油三酯含量的影响如表3所示。与空白组相比较, 油酸模型组内的 TG 含量明显增加。当牡荆素浓度为 25、50 $\mu\text{mol/L}$ 和 100 $\mu\text{mol/L}$ 时, 其处理的细胞的 TG 含量相比于模型组都有一定程度的降低, 并且呈现浓度依赖, 浓度为 100 $\mu\text{mol/L}$ 的效果最好。因此, 牡荆素有望作

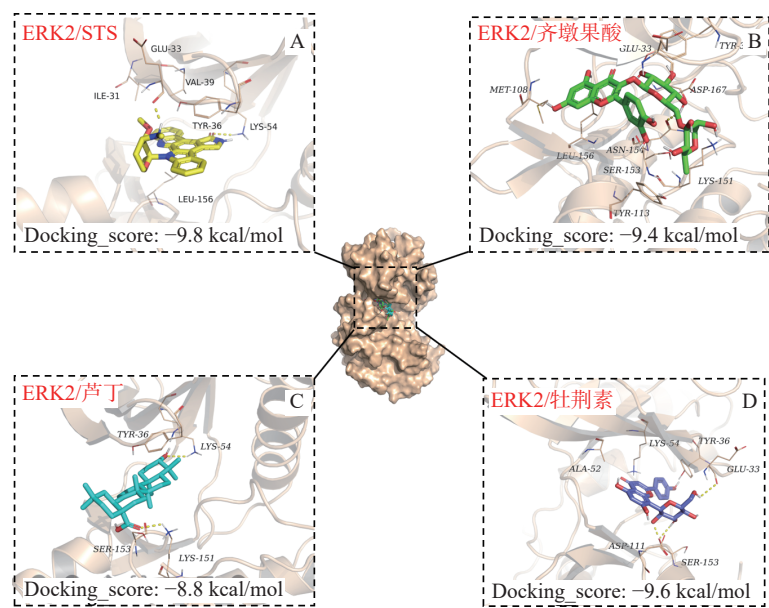


图 7 结合能最低的分子对接模式
Fig.7 Docking mode with lowest binding energies

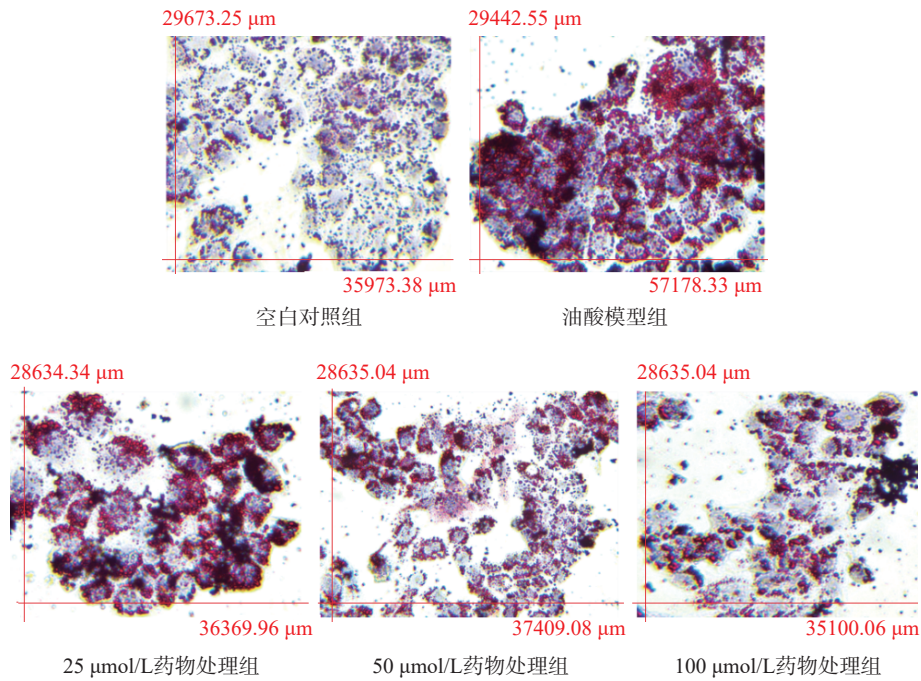


图 8 油红 O 染色图

Fig.8 Oil red O staining chart

为一种降低细胞内血脂含量的潜在治疗化合物。

3 结论

本文基于网络药理学的方法对山楂叶所含有的化合物进行了活性筛选、靶点分析和相关靶点通路预测,筛选得到 93 个活性化合物和 40 个潜在的高血脂症靶点蛋白以及 20 个相关靶蛋白的信号通路。在 ERK2 激酶活性验证实验中,以 STS 为阳性对照药,齐墩果酸、荭草苷、毛蕊花糖苷、芦丁、牡荆素、牡荆素-2''-O-鼠李糖为待测化合物。上述化合物对激酶都有一定的抑制活性,牡荆素效果最好,其抑制率达到 84%, IC_{50} 值为 20.422 $\mu\text{mol/L}$ 。通过分

子对接模式,以结合能为指标对激酶结果进行验证,结果表明牡荆素与 ERK2 蛋白的 LYS-54、SER-153、TYR-36 等残基能相互结合,结合能最低为 -9.6 kcal/mol,与激酶实验结果一致。以 HepG2 细胞建立高血脂症模型,阿托伐他汀为阳性对照药,当浓度为 100 $\mu\text{mol/L}$ 时,牡荆素脂滴减少了 5.4%,说明牡荆素对脂滴的聚集有一定的抑制作用,且随着浓度增大,其抑制作用逐渐增强。甘油三酯试剂盒测定实验中,甘油三酯含量随着牡荆素增加而减少。以上实验结果证实了网络药理学预测山楂叶中牡荆素对高血脂症具有较好抑制作用。

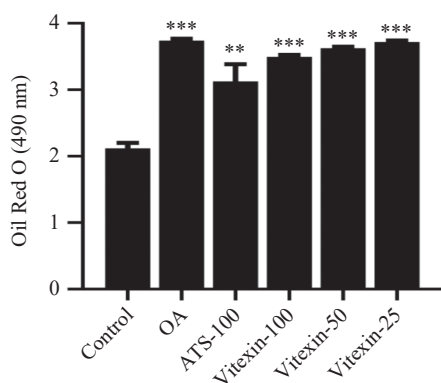


图9 油红O染色定量分析结果

Fig.9 Quantitative analysis results of oil red O staining

注: Control=空白组, OA=油酸模型组, ATS=阿托伐他汀, Vitexin=牡荆素; 与空白组比较, “**” $P<0.05$, “***” $P<0.01$, 纵坐标代表油红O染色的细胞在490 nm处吸光度值。

表3 牡荆素对高脂HepG2细胞甘油三酯含量的影响

Table 3 Effect of vitexin on triglyceride content in high-fat HepG2 cells

组别	甘油三酯含量(mmol/g prot)	P
空白对照组	0.279±0.006	
油酸模型组	0.805±0.024 ^{##}	<0.001
牡荆素25 μmol/L	0.728±0.036 [*]	0.044
牡荆素50 μmol/L	0.556±0.026 ^{**}	<0.001
牡荆素100 μmol/L	0.347±0.039 ^{**}	<0.001

注: 与空白对照组比较, ^{##} $P<0.01$; 与油酸模型组比较, ^{*} $P<0.05$, ^{**} $P<0.01$ 。

参考文献

- [1] 刘瑞杰. 高脂血症和相关疾病[M]. 北京: 科学技术文献出版社, 1999.
- [2] HONG P, GAO Y, WANG, et al. The effectiveness of acupoint catgut embedding in hyperlipidemia with obesity: Protocol for a systematic review and meta-analysis[J]. *Medicine*, 2020, 99(22): e20342.
- [3] 王德河, 王斯. 他汀类药物治疗高脂血症的研究进展[J]. 临床荟萃, 2012, 27(17): 1562-1564. [WANG D H, WANG S. Research progress of statins in the treatment of hyperlipidemia [J] *Clinical Meta-analysis*, 2012, 27 (17): 1562-1564.]
- [4] 王贵平. 他汀类药物治疗高脂血症的研究进展[J]. 中国城乡企业卫生, 2021, 36(8): 42-44. [WANG G P. Research progress of statins in the treatment of hyperlipidemia[J] *China's Urban and Rural Enterprise Health*, 2021, 36(8): 42-44.]
- [5] 罗海东, 李振中. 辛伐他汀联合非诺贝特对比单用辛伐他汀治疗高脂血症疗效与安全性的系统评价[J]. 中国药房, 2015, 26(12): 1658-1661. [LUO H D, LI Z Z. Systematic analysis of the efficacy and safety of simvastatin combined with fenofibrate versus only simvastatin in the treatment of hyperlipidemia[J]. *China Pharmacy*, 2015, 26(12): 1658-1661.]
- [6] 颜腾龙, 易有金. 药食两用中药降血脂作用研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2014(3): 8. [YAN T L, YI Y J. Progress of the lowering blood lipid effect of medicinal and edible medicine[J]. *Journal of Food Safety and Quality*, 2014(3): 8.]
- [7] ZHU J Z, HONG W Y I, HUANG W, et al. Fatty liver dis-

- eases, mechanisms, and potential therapeutic plant medicines[J]. *Chinese Journal of Natural Medicines*, 2020, 18(3): 161-168.
- [8] 詹琤琤, 段时振, 李杰. 中药山楂的化学成分与药理作用研究概况[J]. *湖北中医杂志*, 2012, 34(12): 77-79. [ZHAN C C, DUAN S Z, LI J. Research on chemical constituents and pharmacological effects of Hawthorn[J]. *Hubei Journal of TCM*, 2012, 34(12): 77-79.]
- [9] 高光跃, 冯毓秀. 中药山楂的本草考证[J]. 中国中药杂志, 1994, 19(5): 259-260. [GAO G Y, FENG Y X. Textual research on Chinese herbal medicine hawthorn[J]. *Chinese Journal of Traditional Chinese Medicine*, 1994, 19 (5): 259-260.]
- [10] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典3部[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010.
- [11] HUANG Y, CHEN Z Y, HO W. *Crataegus* (hawthorn)[M]. Beijing: Herbal and Traditional Medicine, 2004.
- [12] MILLER A L. Botanical influences on cardiovascular disease [J]. *Altern Med Rev*, 1998, 3(6): 422-31.
- [13] 鞠利雅. 欧山楂(Aubepine)在法国植物药中的应用[J]. 中国中药杂志, 2005, 30(8): 634-640. [JU L Y. Application of aubepine in French plant medicine [J]. *Chinese Journal of Traditional Chinese Medicine*, 2005, 30 (8): 634.]
- [14] RIGELSKY J M, SWEET B V. Hawthorn: Pharmacology and therapeutic uses[J]. *American Journal of Health-System Pharmacy*, 2002, 59(5): 417-422.
- [15] BARCELOUX D G. Hawthorn (*Crataegus* species) [M]. *Medical Toxicology of Natural Substances: Foods*, 2008, 510-513.
- [16] CHANG Q, ZUO Z, HARRISON F, et al. Hawthorn[J]. *The Journal of Clinical Pharmacology*, 2002, 42(6): 605-612.
- [17] 刁婷婷, 张雨晨, 陈创, 等. 山楂叶总黄酮对高脂血症大鼠血脂的影响及其机制[J]. 医药导报, 2020, 39(6): 757-762. [DIAO T T, ZHANG Y C, CHEN C, et al. Effect and mechanism of hawthorn leaves flavonoids on blood lipid in hyperlipidemia rats[J]. *Herald of Medical*, 2020, 39(6): 757-762.]
- [18] 肖峰, 闵洁, 张雨晨, 等. 山楂叶总黄酮对高脂血症大鼠心脏保护作用实验研究[J]. 湖北科技学院学报: 医学版, 2021, 35(3): 188-192. [XIAO F, MIN J, ZHANG Y C, et al. Study on the protective effect of hawthorn leaves flavonoids on the heart of hyperlipidemia rats[J]. *Journal of Hubei University of Science and Technology (Medical Sciences)*, 2021, 35(3): 188-192.]
- [19] HOPKINS A L. Network pharmacology[J]. *Nature Biotechnology*, 2007, 25(10): 1110-1111.
- [20] 张新庄, 萧伟, 徐筱杰, 等. 利用网络药理学方法研究热毒宁注射液抗流感病毒的分子作用机制[J]. 物理化学学报, 2013, 29(7): 6. [ZHANG X Z, XIAO W, XU X J, et al. Study on mechanism of the reduning injection on the influenza virus using network pharmacology method[J]. *Acta Phys-Chim Sin*, 2013, 29(7): 6.]
- [21] 王文越, 吕琴, 李珩玉, 等. 山楂与野山楂的化学成分对比研究[J]. 山东中医药大学学报, 2021, 45(5): 672-679. [WANG W Y, LYU Q, LI H Y, et al. Comparative study on the chemical components of shanzha(*Crataegi Fructus*) and wild hawthorn[J]. *Journal of Shandong University of TCM*, 2021, 45(5): 672-679.]
- [22] SONG S J, LI L Z, GAO P Y, et al. Terpenoids and hexenes from the leaves of *Crataegus pinnatifida*[J]. *Food Chemistry*, 2011,

- 129(3): 933–939.
- [23] KOVALEVA A M, GONCHAROV N F, KOMISSARENKO A N, et al. GC/MS study of essential oil components from flowers of *Crataegus jackii*, *C. robesoniana*, and *C. flabellata*[J]. *Chemistry of Natural Compounds*, 2009, 45(4): 582–584.
- [24] PYG A, LZL A, YING P B, et al. Monoterpene and lignan glycosides in the leaves of *Crataegus pinnatifida*[J]. *Biochemical Systematics and Ecology*, 2010, 38(5): 988–992.
- [25] GAO P Y, LI L Z, LIU K C, et al. Natural terpenoid glycosides with *in vitro/vivo* antithrombotic profiles from the leaves of *Crataegus pinnatifida*[J]. *RSC Advances*, 2017, 7(76): 48466–48474.
- [26] CHU W, GAO P, LI L. Chemical constituents from the leaves of *Crataegus pinnatifida* Bge[J]. *Biochemical Systematics and Ecology*, 2019, 86: 103923–103923.
- [27] ABU-GHARBIEH E, SHEHAB N G. Therapeutic potentials of *Crataegus azarolus* var. *eu-azarolus* Maire leaves and its isolated compounds[J]. *Bmc Complementary & Alternative Medicine*, 2017, 17(1): 218.
- [28] CHEOW L F, SARKAR A, KOLITZ S, et al. Detecting kinase activities from single cell lysate using concentration-enhanced mobility shift assay[J]. *Analytical Chemistry*, 2014, 86(15): 7455–7462.
- [29] KIM S W, MUISE A M, LYONS P J, et al. Regulation of adipogenesis by a transcriptional repressor that modulates MAPK activation[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276(13): 199–206.
- [30] 王光照. 白藜芦醇的抗炎活性及其介导 TLR4/NF- κ Bp65/MAPKs 信号通路发挥抗炎效应的机制研究[D]. 成都: 四川农业大学, 2017.
- [31] 刘斐斐. 靶向 ERK1/2 激酶抑制剂筛选模型构建及活性化合物发现[D]. 上海: 中国科学院上海药物研究所, 2016.
- [32] HARTIGH L D, ALTMAN R, NORMAN J E, et al. Postprandial VLDL lipolysis products increase monocyte adhesion and lipid droplet formation via activation of ERK2 and NF κ B[J]. *American Journal of Physiology Heart & Circulatory Physiology*, 2014, 306(1): H109.
- [33] PRUSTY, D. Activation of MEK/ERK signaling promotes adipogenesis by enhancing peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) and C/EBP α gene expression during the differentiation of 3T3-L1 preadipocytes[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2002, 277(48): 46226–46232.
- [34] PERRIN D, FREMAUX C, BESSON D, et al. A microfluidics-based mobility shift assay to discover new tyrosine phosphatase inhibitors[J]. *Journal of Biomolecular Screening*, 2006, 11(8): 996–1004.
- [35] 崔叶青, 李嘉, 刘爽, 等. 油红 O 染色鉴定胰腺星状细胞[J]. *中国组织化学与细胞化学杂志*, 2010, 19(5): 522–523. [CUIU Y Q, LI J, LIU S, et al Identification of pancreatic stellate cells by oil red O staining[J]. *Chinese Journal of histochemistry and Cytochemistry*, 2010, 19(5): 522–523.]
- [36] 陈菲, 李丽, 牛钰清, 等. 介绍一种新型高效的油红 O 染色法[J]. *临床与实验病理学杂志*, 2018, 34(7): 808–809. [CHEN F, LI L, NIU Y Q, et al A new and efficient oil red O dyeing method is introduced[J]. *Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 2018, 34 (7): 808–809]
- [37] 李宏权, 张亚峰, 曲丽园, 等. 阿托伐他汀与辛伐他汀治疗原发性高血脂症的疗效比较[J]. *检验医学与临床*, 2014, 11(10): 1402–1403.
- [38] SONG H, SHEN X, ZHOU Y, et al. Black rice anthocyanins alleviate hyperlipidemia, liver steatosis and insulin resistance by regulating lipid metabolism and gut microbiota in obese mice[J]. *Food & Function*, 2021(11): 10160–10170.
- [39] LI X, ZHAO H, YE W, et al. Up-regulation of hypoxia-inducible factor-1 α enhanced the cardioprotective effects of ischemic postconditioning in hyperlipidemic rats[J]. *Acta Biochim Biophys Sin*, 2014, 46(2): 112–118.
- [40] 孙乐. 粗壮女贞总苷降脂作用及其基于 AMPK 通路的降脂作用机制研究[J]. *中国药理学通报*, 2017, 33(8): 7. [SUN L. Study on the lipid-lowering effect of total *Ligustrum lucidum* glycosides and its lipid-lowering mechanism based on AMPK pathway[J] *Chinese Pharmacology Bulletin*, 2017, 33 (8): 7]
- [41] 潘伟东, 杜义龙, 赵胜男, 等. HPLC 法同时测定承德产山楂叶 4 种成分的含量[J]. *承德医学院学报*, 2015, 32(4): 3. [PAN W D, DU Y L, ZHAO S N, et al. Simultaneous determination of 4 components in hawthorn leaves produced in Chengde by HPLC[J]. *Journal of Chengde Medical College*, 2015, 32(4): 3.]
- [42] 宗阳, 姚卫峰, 单进军, 等. 基于网络药理学和分子对接法探寻清宣止咳颗粒治疗儿童新型冠状病毒肺炎活性化合物[J]. *世界中医药*, 2020, 15(4): 477–483. [ZONG Y, YAO W F, SHAN J J, et al. Discussion on the active compounds of qing xuan zhi ke granule in treatment of pediatric coronavirus disease based on network pharmacology and molecular docking method[J]. *World Journal of Traditional Chinese Medicine*, 2020, 15(4): 477–483.]