

基于网络药理学和细胞模型的辣木叶成分降脂研究

郑跃妍, 张子妍, 周 溯, 严晓雪, 陆柏益, 蒋益虹*

(浙江大学生物系统工程与食品科学学院 杭州 310058)

摘要 目的:基于网络药理学方法探究辣木叶中治疗高脂血症的活性成分和作用机制,并通过分子对接和细胞试验进行验证。方法:通过文献挖掘和 CNKI 数据库获取辣木叶的化学成分;通过 Gencards、OMIM、DrugBank 等数据库获取高脂血症主要的疾病靶点。利用 String 平台进行蛋白质相互作用分析,构建 PPI 网络。采用 Metascape 平台进行 GO 和 KEGG 富集分析,并利用 Cytoscape 构建“成分-靶点-通路”网络。通过 AutoDock Vina 进行分子对接,通过 3T3-L1 细胞的 MTT 试验、油红 O 染色以及 qRT-PCR 试验进行试验验证。结果:辣木叶治疗高脂血症的核心活性成分包括芥子酸、棕榈酸、柚皮素等,核心靶点有 ALB、TNF、PPARG、PPARA、VEGFA 等。信号通路主要包括化学致癌-受体激活、AGE-RAGE 信号通路、脂质与动脉粥样硬化、PPAR 信号通路等。分子对接结果显示辣木叶成分和疾病靶点具备强烈的结合活性。细胞试验证明辣木叶黄酮单体(山奈酚、槲皮素和异鼠李素)在较高浓度(50~100 $\mu\text{mol/L}$)时能抑制 3T3-L1 细胞增殖,脂肪含量分别下降 8.45%、16.28%、31.33%;PPARG、VEGFA、TNF 表达显著降低;PPARA/CPT1A 信号通路表达被激活。结论:本文运用网络药理学对辣木叶抗高脂血症的物质基础、作用靶点及通路进行预测,通过分子对接试验及细胞试验证实了预测结果。相关研究结果提示辣木叶有望降低细胞内脂肪含量,并对高脂血症起到潜在治疗作用。

关键词 辣木叶; 高脂血症; 网络药理学; 分子对接; 3T3-L1 细胞

文章编号 1009-7848(2025)02-0039-16 DOI: 10.16429/j.1009-7848.2025.02.004

随着生活方式的演变,我国城市居民的血脂异常患病率急剧攀升,据统计,中国 8.5 亿成年人中,血脂异常的人数高达 3.026 亿,且呈现出年轻化的趋势,由此引发的心血管疾病已成为我国成年人死亡的主要根源^[1]。高脂血症可由血脂升高引起,通常表现为总胆固醇(TC)、总甘油三酯(TG)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)水平升高和高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)水平降低^[2]。近年来,高脂血症的治疗涉及饮食控制、运动和药物治疗,由于他汀类、贝特类等合成降脂药物长期使用通常存在副作用,因此应用天然降脂药物来预防和治疗高脂血症及其并发症显得尤为重要^[3]。

辣木(*Moringa oifera* Lam)是生长在干旱或半干旱地区的一种植物,属于辣木科辣木属中数量最多,分布最广,归化最多的物种之一^[4]。2012 年,辣木叶被原卫生部列为新资源食品,引起广泛的关注^[5]。辣木叶中存在着黄酮类^[6]、多糖类^[7]、生物碱

类^[8]、异硫氰酸酯类^[9]等多种物质,被普遍认为是天然活性成分的来源。此外,研究表明辣木叶具备多种生物活性,如抗氧化^[10]、降血糖^[11]、降血脂^[11]、抗炎^[12]、抗肿瘤^[13]等,并通过多种途径发挥作用。然而,辣木叶中与降脂相关的有效成分、精确作用靶点、信号通路仍未明确。考虑到辣木叶今后在医药、保健品等领域的研究和应用,对辣木叶中有效成分及其相关作用的研究不可或缺。

网络药理学(Network pharmacology)是一门新兴的交叉学科,它基于系统生物学的相关理论,利用特定信号节点(Nodes)进行多靶点药物分子设计,以实现对生物系统的网络分析和应用^[1]。它的主要研究内容集中于 3 个板块:网络构建、网络分析、试验验证,将网络预测与试验验证相结合。由于成分多、靶点多以及组分之间协同作用复杂等原因,深入研究辣木的药理作用变得异常困难^[14]。网络药理学的方法为探究辣木叶复杂体系提供了全新的思路。本研究通过网络药理学方法探究辣木叶中治疗高脂血症的活性成分和作用机制,并通过分子对接和细胞试验进行验证,以期为进一步揭示辣木叶药理作用机制,新药的研发以及合理食用辣木叶提供理论依据。

收稿日期:2024-02-14

基金项目:财政部和农业农村部:国家木薯产业技术体系(CARS-11-ZJLBY)

第一作者:郑跃妍,女,硕士生

通信作者:蒋益虹 E-mail: yhjiang6@zju.edu.cn

1 材料与方法

1.1 辣木叶降血脂的网络药理学研究

1.1.1 辣木叶活性成分及作用靶点收集 利用 CNKI 进行文献检索,获取辣木叶的主要化学成分,并通过 PubChem 数据库及 ChemDraw 22.0.0 软件构建辣木叶活性成分二维数据库^[15]。使用 SwissADME 平台将 2D 结构图转化为获得化合物的 SMILES 结构信息,并进行化学成分的筛选^[16]。将化合物导入 Swiss Target Prediction 平台预测潜在作用靶点^[17]。运用 StataSE 15 将多个化学成分的多个靶点进行汇合、去重,最终获得所需数据。

1.1.2 高脂血症相关靶点筛选 通过 Genecards、DrugBank、OMIM 等疾病基因数据库,以“Hyperlipidemia”为关键词进行筛选。在挑选 Genecards 数据库的目标靶点时,将相关性评分(Relevance score)超过中位数的目标靶点视为高脂血症的潜在靶点,并将这些数据库的结果进行合并去重,得到高脂血症相关疾病的靶点^[17]。

1.1.3 蛋白质相互作用网络构建 利用 R 4.1.2 将辣木叶相关靶点与高脂血症疾病靶点取交集并绘制韦恩图^[18]。将交集靶点提交至 STRING 11.5 数据库构建蛋白互作(PPI)网络模型,将 Organisms 设置为“Homo sapiens”,将蛋白相互作用评分置信度设定为 0.400,得到 PPI 网络^[16]。将分析结果导出至 CytoScape 3.7.1,利用其网络分析功能对网络的拓扑属性进行分析,根据连接度(Degree)、紧密度(Closeness centrality)、介度(Betweenness centrality)筛选出 PPI 网络中辣木叶和疾病的核心靶点^[17]。

1.1.4 GO 生物过程和 KEGG 信号通路富集分析

将辣木叶与高脂血症疾病的交集靶点导入 Metascape 数据库,进行 GO 富集分析和 KEGG 通路富集分析,其中 GO 分析包括其生物过程(Biological process, BP)、分子功能(Molecular function, MF)、细胞组分(Cellular component, CC)分析^[16]。分析完成后使用 R 4.1.2 软件将通路富集结果进行可视化。

1.1.5 “成分-靶点-通路”网络构建 将辣木叶活性成分、潜在作用靶点、KEGG 的富集分析结果导入 Cytoscape 3.7.1 中,构建“成分-靶点-通路”网络。利用其网络分析功能对网络的拓扑属性进行

分析,根据连接度、紧密度、介度筛选出 PPI 网络中辣木叶参与治疗高脂血症相关的核心成分。

1.2 分子对接验证

选取网络药理学预测的 15 个辣木叶主要活性成分与 PPI 网络中 6 个高脂血症关键靶点蛋白进行对接。运用 PubChem 数据库获取 15 个配体 2D 结构,使用 Chem3D 软件使其能量最小化并转化为三维结构^[19]。通过 uniprot 数据库获取关键靶点 uniprot ID,查询 PDB 蛋白质结构数据库获取到蛋白受体的 3D 结构,使用 Pymol 软件删除水分子^[20-21]。将蛋白受体导入 AutoDock Tools 1.5.7 软件进行加氢操作,同时寻找蛋白结构的活性结构;最后通过 AutoDock Vina 进行分子对接,将小分子配体和蛋白受体导入 Pymol 软件中进行可视化,寻找出连接位点和氢键位置^[16]。

1.3 辣木叶黄酮对 3T3-L1 细胞成脂及基因表达的影响

1.3.1 材料与试剂 3T3-L1 前脂肪细胞株,中科院上海细胞库;槲皮素、山奈酚,上海迈瑞尔生化科技有限公司;异鼠李素,3-异丁基-1-甲基黄嘌呤(IBMx),上海创赛科技有限公司;DMEM 高糖培养基(含丙酮酸钠)、PBS 磷酸盐缓冲液、0.25% 胰蛋白酶、青霉素/链霉素溶液,广州 Biosharp 公司;特级胎牛血清(FBS),南京森贝伽生物科技有限公司;MTT 溶液(5 mg/mL),济南聚合通生物科技有限公司;二甲亚砜(DMSO),浙江大学科教服务中心;胰岛素(Insulin, INS),Solarbio 公司;地塞米松(DEX),Sigma-Aldrich 公司;饱和油红 O 染色液,北京索莱宝科技有限公司;RNA 提取试剂盒(RNAiso Plus)、逆转录试剂盒(PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser)、qPCR 试剂盒(TB Green® Premix Ex Taq™ II),日本 TaKaRa 公司;引物由南京擎科生物有限公司合成。

1.3.2 细胞培养及分化 3T3-L1 细胞置于含 10% 胎牛血清和 1% 双抗(青霉素和链霉素)的 DMEM 高糖培养基中,在 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养,每隔 48 h 换液,细胞生长到 80% 汇合后进行传代。将 3T3-L1 细胞悬液接种到 6 孔板,用完全培养基培养 4 d(每隔 2 d 换一次液),使得细胞达到接触抑制;换含 10 μg/mL INS、0.5 mmol/L

IBMX、1 $\mu\text{mol/L}$ DEX 的分化剂 I 培养 48 h; 后换含 10 $\mu\text{g/mL}$ INS 的分化剂 II 培养 48 h; 再更换正常完全培养基培养, 隔天换液 1 次, 至第 12 天约 90% 以上的脂滴明显, 即为培养分化成熟^[22]。细胞诱导分化的每个换液阶段持续补充相应活性成分, 分为空白组 (不进行诱导分化)、对照组 (仅进行诱导分化)、槲皮素组、山奈酚组及异鼠李素组 (进行诱导分化并分别添加不同活性成分)。

1.3.3 MTT 试验 采用 MTT 法分别检测 0, 5, 10, 20, 50, 80, 100 $\mu\text{mol/L}$ 槲皮素、山奈酚、异鼠李素对细胞活力的影响。将 3T3-L1 脂肪细胞接种于 96 孔板中, 分别用不同浓度梯度的槲皮素、山奈酚、异鼠李素培养 24 h。每孔加入 MTT 溶液 (终质量浓度为 0.5 mg/mL), 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 4 h, 倒去废液后每孔加入 150 μL 的 DMSO 溶液, 置于摇床上振荡 10 min, 使结晶甲瓩完全溶解, 用酶标仪测定波长 570 nm 处的吸光度^[23]。细胞活力计算公式如下:

$$\text{细胞相对存活率}(\%) = [A_{570\text{nm}}(\text{试验组}) - A_{570\text{nm}}(\text{空白组})] / [A_{570\text{nm}}(\text{对照组}) - A_{570\text{nm}}(\text{空白组})] \times 100 \quad (1)$$

1.3.4 油红 O 染色 完成分化诱导后, 使用油红 O 染色法检测槲皮素、山奈酚、异鼠李素对脂肪细胞脂滴累积的影响。移除细胞培养基, 用 PBS 洗 2 次, 加 4% 多聚甲醛固定 30 min。弃去固定液并用无菌水洗 2 次, 加入 1 mL 60% 异丙醇浸洗 30 s。弃去 60% 异丙醇后避光加入新配制好的油红 O 工作液, 避光放置 20 min。弃去染色液, 用 60% 异丙醇漂洗 10~20 s 至间质清晰, 水洗 2 次, 直到无多余染液。最后加入适量蒸馏水, 在光学显微镜下观察细胞形态以及脂滴水平并拍照。

观察结束后弃去液体, 每孔加 1 mL 异丙醇, 将孔板低速振荡摇晃, 至细胞内脂滴溶解, 将混匀后的异丙醇溶液吸入到 96 孔板中。用酶标仪检测 510 nm 处的吸光度值, 记录数据并根据检测出的 OD 值分析相对脂滴含量。

$$\text{相对脂滴含量}(\%) = [A_{510\text{nm}}(\text{试验组}) - A_{510\text{nm}}(\text{空白组})] / [A_{510\text{nm}}(\text{对照组}) - A_{510\text{nm}}(\text{空白组})] \times 100 \quad (2)$$

1.3.5 qRT-PCR 试验 提取 3T3-L1 细胞 RNA, 运用微量分光光度计对其进行浓度和纯度的测定。通过 NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 平台设计基因引物, 使用内参引物为 GAPDH, 根据网络药理学 PPI 网络以及 KEGG 富集分析结果, 确定相关靶点并设计引物。按照试剂盒说明书进行逆转录合成 cDNA, 并在 20 μL 反应体系下, 进行 qPCR 反应, 反应条件如下: 95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 共 40 个循环。利用相对定量法对数据进行分析, 以 GAPDH 作为内参计算目的基因的表达量变化^[16]。

2 结果

2.1 辣木叶降血脂的网络药理学研究

2.1.1 辣木叶活性成分及作用靶点 如表 1 所示, 本研究共筛选出 72 个活性成分, 主要包含黄酮类、多酚类、苯丙素类、生物碱类、有机酸及其酯类等, 编号为 M01-M72。将辣木叶 72 种潜在活性成分 SMILES 结构信息导入到 SwissTargetPrediction 平台, 最终整合去重得到辣木叶成分作用靶点 642 个。

表 1 辣木叶有效成分信息

Table 1 Information on active components of *Moringa oleifera* leaves

ID	化合物名称	成分类型
M01	异鼠李素 (Isorhamnetin)	黄酮类
M02	大豆黄素 (Daidzein)	黄酮类
M03	金雀异黄素 (Genistein)	黄酮类
M04	橙皮素 (Hesperetin)	黄酮类
M05	芹菜素 (Apigenin)	黄酮类
M06	儿茶素 (Catechin)	黄酮类
M07	山奈酚 (Kaempferol)	黄酮类
M08	表儿茶素 (Epicatechin)	黄酮类
M09	槲皮素 (Quercetin)	黄酮类
M10	木犀草苷 (Luteolin)	黄酮类
M11	柚皮素 (Naringenin)	黄酮类

(续表 1)

ID	化合物名称	成分类型
M12	3-羟基酪醇(3-Hydroxytyrosol)	多酚类
M13	原儿茶酸(Protocatechuic acid)	多酚类
M14	表儿茶素(Epicatechin)	多酚类
M15	4-氨基苯甲酸(4-Aminobenzoic acid)	多酚类
M16	对-香豆素酸(<i>p</i> -Coumaric acid)	多酚类
M17	没食子酸(Gallic acid)	多酚类
M18	香草酸(Vanillic acid)	多酚类
M19	对羟基苯甲酸(<i>p</i> -Hydroxybenzoic acid)	多酚类
M20	儿茶酚(Catechol)	多酚类
M21	阿魏酸(Ferulic acid)	多酚类
M22	3,4,5-三甲氧基肉桂酸(3,4,5-Trimethoxycinnamic acid)	多酚类
M23	鞣花酸(Ellagic acid)	多酚类
M24	白藜芦醇(Resveratrol)	多酚类
M25	丁香酸(Syringic acid)	多酚类
M26	2,6-二叔丁基-4-甲基苯酚(2,6-Di-tertbutyl-4-methylphenol)	多酚类
M27	邻苯三酚(Pyrogallol)	多酚类
M28	邻苯二酚(Catechol)	多酚类
M29	香草醛(Vanillin)	多酚类
M30	龙胆酸(Gentisic acid)	多酚类
M31	咖啡酸(Caffeic acid)	多酚类
M32	间苯二酚(Resorcinol)	多酚类
M33	丁香酚(Eugenol)	多酚类
M34	苯酚(Phenol)	多酚类
M35	3-甲氧基蒽黄素(Cirsilineol)	多酚类
M36	肉桂酸(Cinnamic acid)	苯丙素类
M37	香豆素(Coumarin)	苯丙素类
M38	对香豆酸(<i>p</i> -Coumaric acid)	苯丙素类
M39	异阿魏酸(Isoferulic acid)	苯丙素类
M40	芥子酸(Sinapinic acid)	苯丙素类
M41	3,4,5-三甲氧基肉桂酸(3,4,5-Trimethoxycinnamic acid)	苯丙素类
M42	邻香豆酸(<i>o</i> -Coumaric acid)	苯丙素类
M43	芳樟醇(Linalool)	萜类
M44	辣木米宁 A(Niaziminin A)	生物碱类
M45	辣木米宁 B(Niaziminin B)	生物碱类
M46	辣木米 A(Niaziminin A)	生物碱类
M47	辣木米辛(Niazimicin)	生物碱类
M48	4-(α -L-鼠李糖氧基)苯基乙腈[4-(α -L-Rhamnopyranosyloxy)phenylacetoneitrile]	生物碱类
M49	辣木宁(Niazicin A)	生物碱类
M50	印度辣木素(Pterygospermin)	生物碱类
M51	奎宁(Quinines)	生物碱类
M52	玉米素(Zeatin)	生物碱类
M53	吡咯酰胺 4'- <i>o</i> - α -L-鼠李吡喃糖苷 (Pyrrolemarumine 4'- <i>o</i> - α -L-Rhamnopyranoside)	生物碱类
M54	甲基 4-(α -L-鼠李糖吡喃糖氧基)苄基氨基甲酸甲酯[Methyl 4-(α -L-Rhamnopyranosyloxy)benzylcarbamate]	生物碱类
M55	4'-羟基苯乙酰胺- α -L-吡喃鼠李糖苷 (4'-Hydroxy phenylethanamide- α -L-rhamnopyranoside)	生物碱类

(续表 1)

ID	化合物名称	成分类型
M56	4-(4'- <i>o</i> -乙酰基- α - <i>L</i> -鼠李糖氧基)苄基异硫氰酸酯[4-(4'- <i>o</i> -Acetyl- α - <i>L</i> -rhamnosyloxy)benzylisothiocyanate]	异硫氰酸酯类
M57	4-(α - <i>L</i> -鼠李糖氧基)苄基异硫氰酸酯 [4-(α - <i>L</i> -Rhamnosyloxy)benzylisothiocyanate]	异硫氰酸酯类
M58	4-(2'- <i>o</i> -乙酰基- α - <i>L</i> -鼠李糖氧基)苄基异硫氰酸酯[4-(2'- <i>o</i> -Acetyl- α - <i>L</i> -rhamnosyloxy)benzylisothiocyanate]	异硫氰酸酯类
M59	4-(3'- <i>o</i> -乙酰基- α - <i>L</i> -鼠李糖氧基)苄基异硫氰酸酯[4-(3'- <i>o</i> -Acetyl- α - <i>L</i> -rhamnosyloxy)benzylisothiocyanate]	异硫氰酸酯类
M60	异硫氰酸苄酯(Benzyl isothiocyanate)	异硫氰酸酯类
M61	苹果酸(Malic acid)	有机酸及其酯类
M62	抗坏血酸(Ascorbic acid)	有机酸及其酯类
M63	四羟基苯丙酸甲酯[Methyl 3-(4-hydroxyphenyl)propionate]	有机酸及其酯类
M64	柠檬酸三乙酯(Triethyl citrate)	有机酸及其酯类
M65	棕榈酸(Palmitic acid)	有机酸及其酯类
M66	氢过氧十八碳三烯酸(Hydroperoxyoctadecatrienoic acid)	有机酸及其酯类
M67	三羟基十八碳二烯酸(Trihydroxyoctadecadienoic acid)	有机酸及其酯类
M68	棕榈酰甘油(Palmitoylglycerol)	有机酸及其酯类
M69	9-羟基-10,12,15-十八碳三烯酸(9-Hydroxy-10,12,15-octadecatrienoic acid)	有机酸及其酯类
M70	3-羟基十八烷酸(3-Hydroxyoctadecanoic acid)	有机酸及其酯类
M71	13-羟基-9,11,15-十八碳三烯酸(13-Hydroxy-9,11,15-octadecatrienoic acid)	有机酸及其酯类
M72	十五烷酸(Pentadecanoic acid)	有机酸及其酯类

2.1.2 高脂血症疾病靶点 在疾病基因数据库中,设置筛查的关键词为“Hyperlipidemia”,通过一系列相关指标的筛选,从数据库中分别获取了 1 969 个和 55 个靶点数据;在 Genecards 数据库中筛选出 1 039 个靶点数据。通过对以上数据库结果进行合并和去重,确定了 1 063 个与高脂血症相关的疾病靶点。利用 R 4.1.2 将辣木叶相关靶点与高脂血症疾病靶点取交集并绘制韦恩图,得到 115 个交集靶点数(如图 1)。

2.1.3 辣木叶治疗高脂血症的 PPI 网络分析 将 115 个共同靶点导入到 STRING11.5 数据库中,构建 PPI 网络。使用 Cytoscape3.7.1 进行可视化处理,最终得到 PPI 网络。如图 2 所示,共有 115 个节点和 1 174 条边,其中圆圈代表蛋白质,连线代表蛋白质间的相互作用。在 PPI 网络中,节点的大小和颜色与高脂血症蛋白靶点的程度呈正相关关系,随着颜色的加深相互作用关系增强。ALB、TNF、PPARG、PPARA、VEGFA 等靶点颜色较深面积较大,因此可能是高脂血症的关键作用靶点。

利用靶点的拓扑参数筛选蛋白互作网络中的关键靶点。经计算,该网络连接度平均为 20.78,介

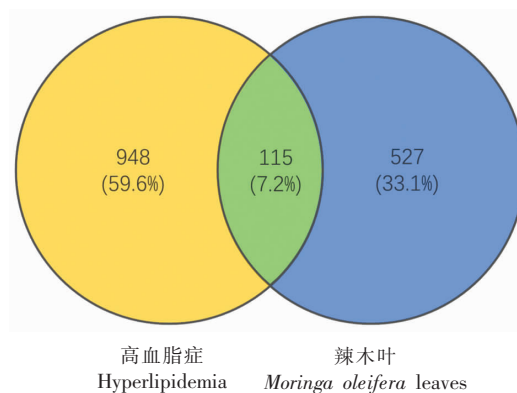


图 1 高脂血症靶点和辣木叶靶点韦恩图
Fig.1 Venn map of hyperlipidemia target and *Moringa oleifera* leaves target

度平均为 0.008797,紧密度平均为 0.515461,选择三者均大于平均值的节点作为候选靶点,得到辣木叶治疗高脂血症的关键靶点 22 个,包括 ALB、TNF、PPARG、PPARA、VEGFA、EGFR、CTNNB1、CXCL8、MMP9、ESR1 等,相关拓扑参数详见表 2。

2.1.4 辣木叶治疗高脂血症的 GO 和 KEGG 富集分析 将辣木叶与高脂血症疾病的交集靶点导入 Metascape 数据库进行 GO 富集分析,并使用 R

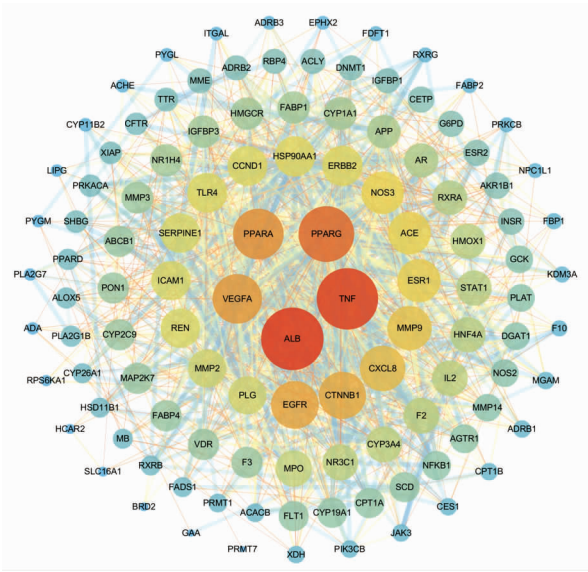


图2 辣木叶-高血脂症靶点 PPI 网络

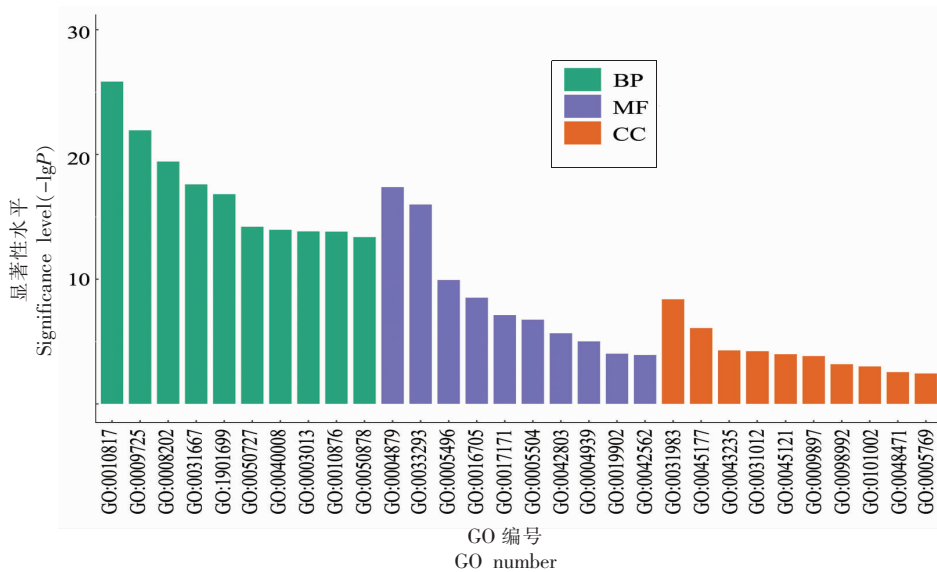
Fig.2 *Moringa oleifera* leaves-hyperlipidemia target PPI network

4.1.2 软件将富集结果进行可视化。共富集到 1 142 条 BP、64 条 CC、114 条 MF, BP 中排名靠前的主要为激素水平的调节、炎症反应的调节、生长的调节、体液水平的调节、类固醇代谢过程等;CC 主要有囊泡腔、细胞顶端、受体复合物、细胞外基质、薄膜筏等;MF 主要有单羧酸结合、类固醇结合、脂肪酸结合、磷酸酶结合、激素结合等。调整 *P* 值小于 0.01,取排名前 10 位的富集结果(见图 3 及表 3)。

表 2 辣木叶治疗高血脂症关键靶点拓扑参数

Table 2 Topological parameters of key targets for the treatment of hyperlipidemia with *Moringa oleifera* leaves

序号	关键靶点	连接度	介度	紧密度
1	ALB	76	0.10342263	0.75167785
2	TNF	74	0.0909287	0.73684211
3	PPARG	64	0.09292831	0.69565217
4	PPARA	55	0.08146999	0.65882353
5	VEGFA	53	0.02250335	0.64000000
6	EGFR	50	0.03190679	0.63276836
7	CTNNA1	49	0.02991872	0.63276836
8	CXCL8	46	0.01269444	0.61202186
9	MMP9	44	0.01645662	0.60869565
10	ESR1	42	0.01919561	0.58947368
11	ACE	41	0.02158888	0.59893048
12	NOS3	41	0.0283578	0.59893048
13	ERBB2	37	0.0126968	0.58031088
14	HSP90AA1	37	0.01492615	0.59259259
15	CCND1	36	0.01538957	0.58333333
16	REN	35	0.01078666	0.57435897
17	CYP3A4	29	0.01000147	0.56565657
18	HNF4A	28	0.01975135	0.56281407
19	RXRA	27	0.01173469	0.55172414
20	AR	26	0.01107168	0.53588517
21	HMGR	23	0.00932345	0.5410628
22	NR1H4	23	0.01036902	0.54634146



注:图中各编号对应的信息详见表 3。

图 3 辣木叶-高血脂症靶点 GO 富集分析

Fig.3 GO enrichment analysis of *Moringa oleifera* leaves-hyperlipidemia targets

表 3 辣木叶-高脂血症靶点 GO 富集分析

Table 3 GO enrichment analysis of *Moringa oleifera* leaves-hyperlipidemia targets

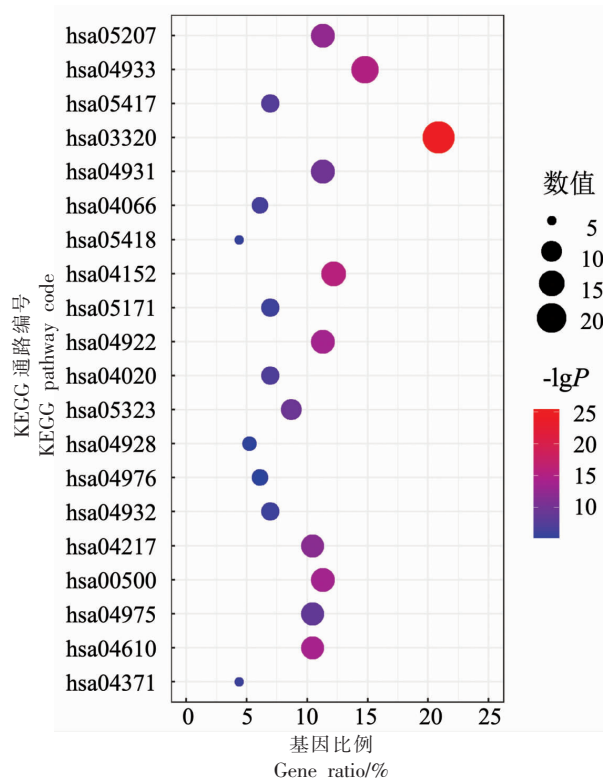
分析类型	GO 编号	描述
BP	GO:0010817	激素水平的调节 (Regulation of hormone levels)
BP	GO:0009725	对激素的响应 (Response to hormone)
BP	GO:0008202	类固醇代谢过程 (Steroid metabolic process)
BP	GO:0031667	对营养水平的响应 (Response to nutrient levels)
BP	GO:1901699	细胞对氮化合物的响应 (Cellular response to nitrogen compound)
BP	GO:0050727	炎症反应的调节 (Regulation of inflammatory response)
BP	GO:0040008	生长的调节 (Regulation of growth)
BP	GO:0003013	循环系统过程 (Circulatory system process)
BP	GO:0010876	脂质定位 (Lipid localization)
BP	GO:0050878	体液水平的调节 (Regulation of body fluid levels)
MF	GO:0004879	核受体活性 (Nuclear receptor activity)
MF	GO:0033293	单羧酸结合 (Monocarboxylic acid binding)
MF	GO:0005496	类固醇结合 (Steroid binding)
MF	GO:0016705	氧化还原酶活性 (Oxidoreductase activity)
MF	GO:0017171	丝氨酸水解酶活性 (Serine hydrolase activity)
MF	GO:0005504	脂肪酸结合 (Fatty acid binding)
MF	GO:0042803	蛋白质同源二聚化活性 (Protein homodimerization activity)
MF	GO:0004939	β -肾上腺素能受体活性 (Beta-adrenergic receptor activity)
MF	GO:0019902	磷酸酶结合 (Phosphatase binding)
MF	GO:0042562	激素结合 (Hormone binding)
CC	GO:0031983	囊泡腔 (Vesicle lumen)
CC	GO:0045177	细胞顶侧部分 (Apical part of cell)
CC	GO:0043235	受体复合物 (Receptor complex)
CC	GO:0031012	细胞外基质 (Extracellular matrix)
CC	GO:0045121	薄膜筏 (Membrane raft)
CC	GO:0009897	质膜外侧 (External side of plasma membrane)
CC	GO:0098992	神经元致密核心囊泡 (Neuronal dense core vesicle)
CC	GO:0101002	富含 Ficolin-1 的颗粒 (Ficolin-1-rich granule)
CC	GO:0048471	细胞质核周区域 (Perinuclear region of cytoplasm)
CC	GO:0005769	早期内体 (Early endosome)

KEGG 通路富集分析共得到 171 个条目,根据调整 P 值小于 0.01, 取排名前 20 位的富集条目,并利用 R 4.1.2 绘制气泡图(见图 4)。结果显示,多条信号通路与高脂血症密切相关,包括化学致癌-受体激活、糖尿病并发症中的 AGE-RAGE 信号通路、脂质与动脉粥样硬化、PPAR 信号通路、胰岛素抵抗、HIF-1 信号通路等,通路富集结果及其对应靶点详见表 4。

2.1.5 辣木叶成分-高脂血症靶点-通路网络图的分析 将 2.1.2、2.1.3、2.1.4 节结果导入 Cytoscape 3.7.1 中,构建“成分-靶点-通路”网络。如图 5 所示,黄色圆圈代表辣木叶中的化学成分,蓝色方块

代表疾病靶点,绿色箭头代表作用通路。据分析,辣木叶的潜在靶点参与了前 20 条通路的富集,且通路之间存在共同靶点,表明辣木叶能够对多条通路产生作用,且通路之间相互影响,共同发挥了干预高脂血症的作用。

对靶点的拓扑参数进行筛选,得到对高脂血症有影响的核心成分。图 5 中,195 个节点、852 条边、20 个箭头型节点代表的信号通路、115 个方形节点代表的高脂血症靶蛋白以及 60 个圆形节点代表的辣木叶化学成分,节点面积越大,代表的连接度越高,重要性越大。该网络连接度平均为 8.74,介度平均为 0.010747,紧密度平均为 0.330406,选



注:图中各编号对应的 KEGG 通路信息详见表 4。

图 4 辣木叶-高脂血症靶点 KEGG 富集分析

Fig.4 KEGG enrichment analysis of *Moringa oleifera* leaves-hyperlipidemia target

表 4 KEGG 富集通路及其对应靶点

Table 4 KEGG enrichment pathways and their corresponding targets

KEGG 通路编号	描述	靶点
hsa05207	化学致癌-受体激活 (Chemical carcinogenesis - receptor activation)	ADRB1 ADRB2 ADRB3 XIAP AR CCND1 CYP1A1 CYP3A4 EGFR EPHX2 ESR1 ESR2 HSP90AA1 NFKB1 PIK3CB PPARA PRKACA PRKCB RPS6KA1 RXRA RXRBI RXRG VDR VEGFA
hsa04933	糖尿病并发症中的 AGE-RAGE 信号通路 (AGE-RAGE signaling pathway in diabetic complications)	AGTR1 CCND1 F3 ICAM1 CXCL8 IMMP2 NFKB1 NOS3 SERPINE1 PIK3CB PRKCB STAT1 TNF VEGFA
hsa05417	脂质与动脉粥样硬化 (Lipid and atherosclerosis)	CYP1A1 CYP2C9 HSP90AA1 ICAM1 CXCL8 MMP3 MMP9 NFKB1 NOS3 PIK3CB PPARG MAP2K7 RXRA RXRBI RXRG TLR4 TNF
hsa03320	PPAR 信号通路 (PPAR signaling pathway)	CPT1A CPT1B FABP4 FABP1 FABP2 PPARA PPARD PPARG RXRA RXRB RXRG SCD
hsa04931	胰岛素抵抗 (Insulin resistance)	ACACB CPT1A CPT1B INSR NFKB1 NOS3 PIK3CB PPARA PRKCB PYGL PYGM RPS6KA1 TNF
hsa04066	HIF-1 信号通路 (HIF-1 signaling pathway)	EGFR ERBB2 FLT1 HMOX1 INSR NFKB1 NOS2 NOS3 SERPINE1 PIK3CB PRKCB TLR4 VEGFA
hsa05418	流体剪切应力与动脉粥样硬化 (Fluid shear stress and atherosclerosis)	CTNNB1 HMOX1 HSP90AA1 ICAM1 MMP2 MMP9 NFKB1 NOS3 PIK3CB PLAT MAP2K7 TNF VEGFA

(续表 4)

KEGG 通路编号	描述	靶点
hsa04152	AMPK 信号通路 (AMPK signaling pathway)	ACACB CCND1 CFTR CPT1A CPT1B FBP1 HMGCR HNF4A INSR PIK3CB PPARG SCD
hsa05171	冠状病毒病-新冠肺炎 (Coronavirus disease - COVID-19)	AGTR1 ACE EGFR F2 IL2 CXCL8 MMP3 NFkB1 PIK3CB PRKCB STAT1 TLR4 TNF
hsa04922	胰高血糖素信号通路 (Glucagon signaling pathway)	ACACB CPT1A CPT1B FBP1 GCK IPRMT1 PPARA PRKACA PYGL PYGM
hsa04020	钙信号通路 (Calcium signaling pathway)	ADRB1 ADRB2 ADRB3 AGTR1 EGFR ERBB2 FLT1 NOS2 NOS3 PRKACA PRKCB VEGFA
hsa05323	类风湿性关节炎 (Rheumatoid arthritis)	FLT1 ICAM1 CXCL8 ITGAL MMP3 TLR4 TNF VEGFA
hsa04928	甲状旁腺激素的合成、分泌和作用 (Parathyroid hormone synthesis, secretion and action)	EGFR MMP14 PRKACA PRKCB RXRA RXRB RXRG VDR
hsa04976	胆汁分泌 (Bile secretion)	CFTR CYP3A4 HMGCR ABCB1 PRKACA RXRA NR1H4
hsa04932	非酒精性脂肪肝 (Non-alcoholic fatty liver disease)	CXCL8 INSR NFkB1 PIK3CB PPARA PPARG RXRA TNF
hsa04217	坏死 (Necroptosis)	XIAPHSP90AA1 JAK3 PYGL PYGM STAT1 TLR4 TNF
hsa00500	淀粉和蔗糖代谢 (Starch and sucrose metabolism)	GAA GCK PYGL PYGM MGAM
hsa04975	脂肪消化和吸收 (Fat digestion and absorption)	FABP1 FABP2 PLA2G1B DGAT1 NPC1L1
hsa04610	补体和凝血级联 (Complement and coagulation cascades)	F2 F3 F10 SERPINE1 PLAT PLG
hsa04371	Apelin 信号通路 (Apelin signaling pathway)	AGTR1 CCND1 NOS2 NOS3 SERPINE1 PLAT PRKACA

择连三者均大于平均值的节点作为候选，并筛选前 15 个节点得到辣木叶治疗高脂血症的关键成分,包括芥子酸、棕榈酸、金雀异黄素、柚皮素、十五烷酸、木犀草苷、芹菜素、异鼠李素、白藜芦醇、山柰酚、橙皮素、3,4,5-三甲氧基肉桂酸、3-羟基十八烷酸、槲皮素、3-甲氧基黄酮等,相关拓扑参数详见表 5。

2.2 分子对接分析

将 PPI 网络筛选出的 6 个关键靶点，包括 ALB、TNF、PPARG、PPARA、VEGFA、EGFR (靶点对应中英名称及其 Uniprot ID 见表 6)与“成分-靶点-通路”网络中筛选出的前 15 个关键活性成分进行分子对接。结合能统计结果如图 6 所示,随着颜色加深,配体分子与受体蛋白的结合能力逐渐增强。90 个受体-配体对接组合中有 66 个结合能低于(-20.92 kJ/mol),占比 73.3%;42 组辣木叶的结合能小于(-29.29 kJ/mol),占比 46.7%,表明其主要活性成分与核心靶点之间存在强烈结合作

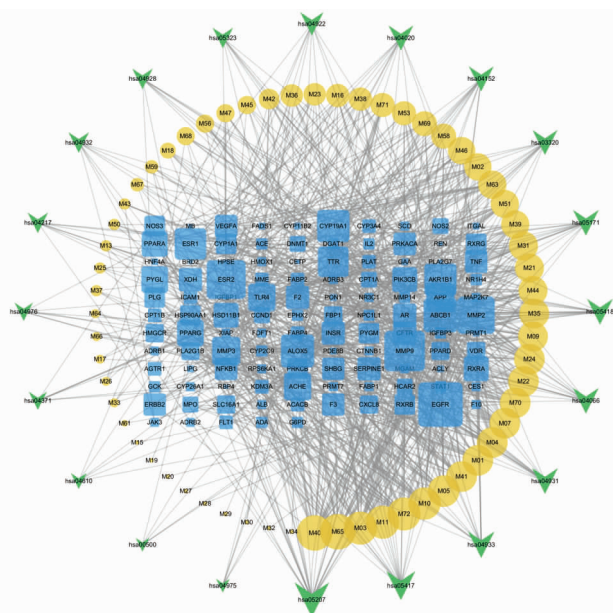


图 5 辣木叶成分-高脂血症靶点-通路网络图
Fig.5 *Moringa oleifera* leaves-hyperlipidemia target pathway network diagram

表5 辣木叶主要活性成分网络节点特征参数

Table 5 Main active ingredient network node characteristic parameters of *Moringa oleifera* leaves

ID	化学成分	连接度	紧密度	介度
M40	芥子酸	25	0.405010	0.059208
M65	棕榈酸	25	0.388778	0.059244
M03	金雀异黄素	22	0.405010	0.049170
M11	柚皮素	22	0.396728	0.041257
M72	十五烷酸	22	0.372361	0.040643
M10	木犀草苷	21	0.408421	0.022592
M05	芹菜素	20	0.405010	0.020184
M01	异鼠李素	19	0.405010	0.016795
M24	白藜芦醇	19	0.398357	0.026513
M07	山柰酚	19	0.396728	0.014622
M04	橙皮素	19	0.395112	0.034519
M22	3,4,5-三甲氧基肉桂酸	19	0.393509	0.021278
M70	3-羟基十八烷酸	19	0.358595	0.031689
M09	槲皮素	18	0.401656	0.014501
M35	3-甲氧基蒽黄素	18	0.395112	0.015355

表6 高脂血症相关的关键蛋白靶点

Table 6 Key protein targets related to hyperlipidemia

蛋白靶点全称	蛋白靶点缩写	Uniprot ID
血清白蛋白	ALB	P02768
肿瘤坏死因子	TNF	P01375
过氧化物酶体增殖物	PPARG	P37231
激活受体 γ		
过氧化物酶体增殖物	PPARA	Q07869
激活受体 α		
血管内皮生长因子 A	VEGFA	P15692
表皮生长因子受体	EGFR	P00533

用,由此初步验证网络药理学的预测结果,说明辣木叶可能通过关键靶点干预高脂血症及其相关通路,达到改善或者治疗高脂血症的作用。

由分子对接热力图可知,EGFR、PPARA、ALB蛋白受体与配体的结合能普遍较高,推测具有较强的结合活性。分别取3个蛋白靶点所对应结合能最高的2个小分子配体(共6组,包括EGFR-木犀草苷、EGFR-槲皮素、ALB-芹菜素、ALB-木犀草苷、PPARA-芹菜素、PPARA-木犀草苷等),进行配体-受体对接模式的分析,利用Pymol进行可视化,观察配体与受体的作用位点及其作用化学键,进行微观层面的分析,结果如图7所示。由图可知辣木叶活性成分主要通过氢键相互作用促使辣木叶小分子配体结合到蛋白受体活性位点。

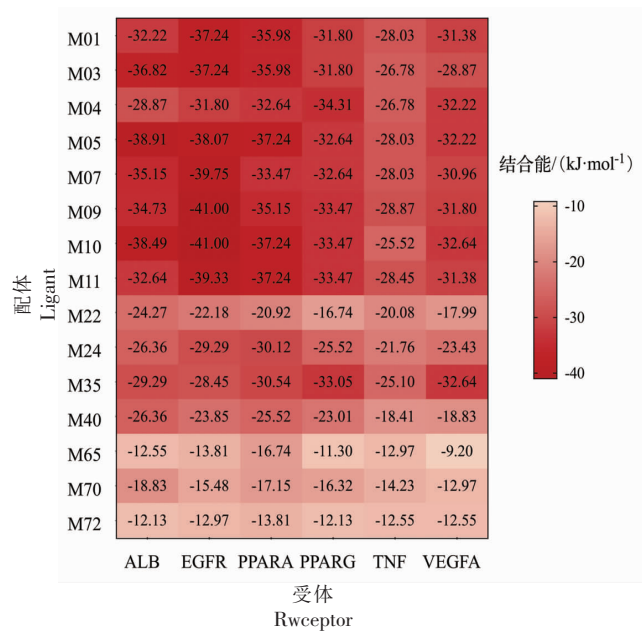


图6 分子对接热力图分析

Fig.6 Thermodynamic analysis of molecular docking

2.3 辣木叶黄酮对 3T3-L1 细胞成脂及基因表达的影响

2.3.1 辣木叶黄酮单体对 3T3-L1 细胞增殖的影响 采用 MTT 法检测 0,5,10,20,50,80,100 $\mu\text{mol/L}$ 浓度梯度的槲皮素 (Quercetin)、山柰酚 (Kaempferol)、异鼠李素 (Isorhamnetin) 对细胞活

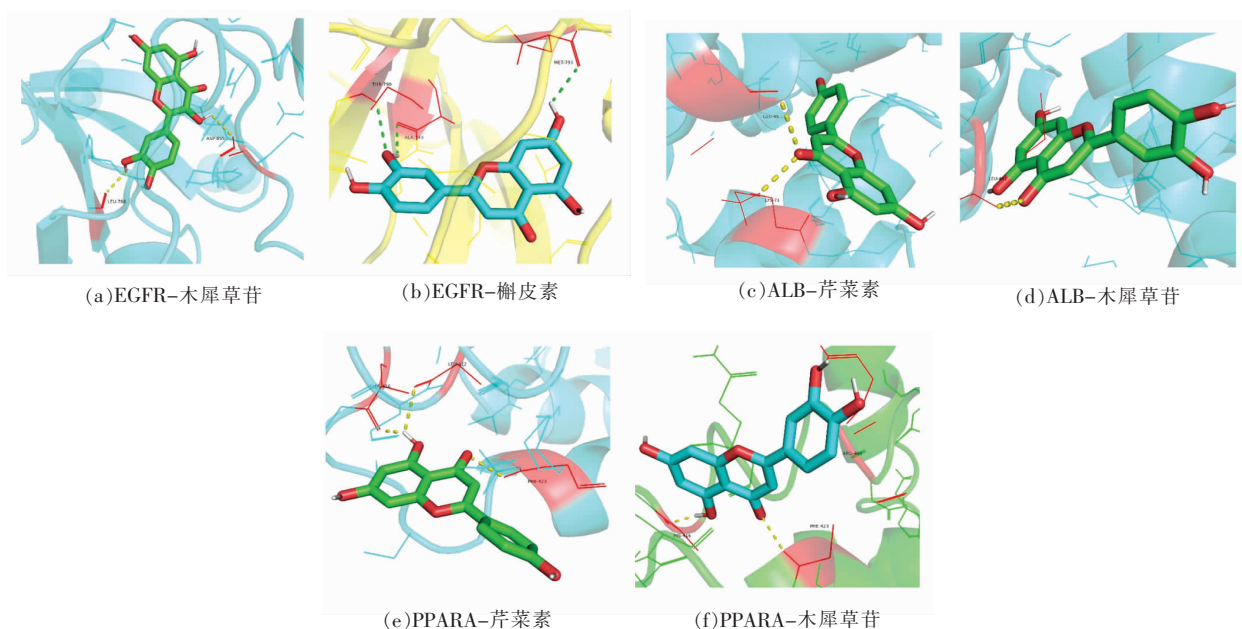


图 7 分子对接相互作用示意图

Fig.7 Schematic diagram of molecular docking interaction

力的影响,结果见图 8。试验表明,100 $\mu\text{mol/L}$ 的槲皮素、山奈酚、异鼠李素均能显著抑制 3T3-L1 细胞增殖,抑制率依次为 39.37%,30.32% 和 38.45%;在中、低浓度的处理条件下,槲皮素和山奈酚对前脂肪细胞的增殖并未产生显著影响;在

浓度为 50 $\mu\text{mol/L}$ 和 80 $\mu\text{mol/L}$ 的处理条件下,异鼠李素表现出较强抑制效果,抑制率分别达到了 58.04% 和 57.30%,然而在低浓度处理条件下,其影响并不显著。因此,在不过度损害细胞的前提下,后续药物处理的浓度应在 5~50 $\mu\text{mol/L}$ 之间。

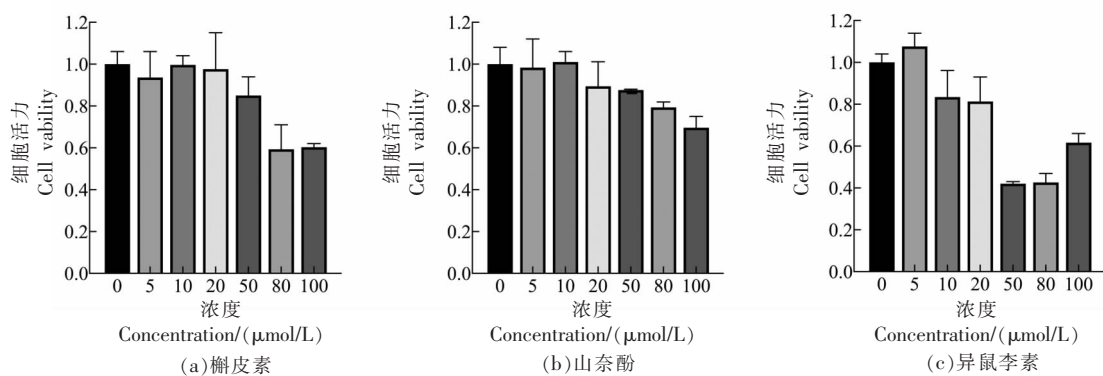


图 8 辣木叶提取物中 3 种黄酮对 3T3-L1 前脂肪细胞的增殖抑制影响

Fig.8 The inhibitory effect of three flavonoids in the extract of *Moringa oleifera* leaves on the proliferation of 3T3-L1 preadipocytes

2.3.2 辣木叶黄酮单体对 3T3-L1 细胞分化的影响 通过油红 O 染色法检测 3 种化合物对细胞分化及其脂滴累积的影响,结果见图 9。与对照组相比,加入黄酮药物后,3T3-L1 细胞的分化受到了不同程度的抑制,细胞脂滴大小减小,聚集明显减少,分布变稀疏。其中槲皮素抑制作用最弱,山奈酚抑制作用中等,异鼠李素抑制作用最强,活性物

浓度为 50 $\mu\text{mol/L}$ 时,其脂肪含量分别下降 8.45%, 16.28%,31.33%。此外,通过探究不同浓度异鼠李素对细胞分化的作用可以发现,细胞中的脂肪积累随着异鼠李素加入浓度的升高而逐渐减少,含量下降 23.75% (20 $\mu\text{mol/L}$) 和 31.33% (50 $\mu\text{mol/L}$)。

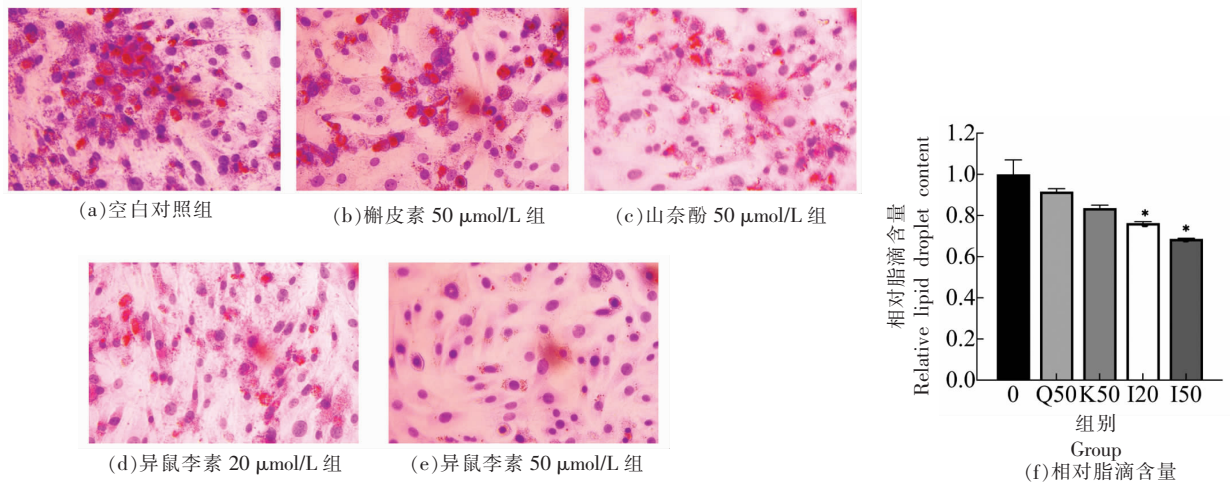


图9 不同活性成分对3T3-L1脂肪细胞脂质积累的影响

Fig.9 Effects of different bioactive compounds on lipid accumulation in 3T3-L1 adipocytes

2.3.3 辣木叶黄酮单体对分化脂肪细胞内脂代谢相关因子的影响 根据网络药理学 PPI 网络以及 KEGG 富集分析结果, 确定相关靶点为 TNF、

PPARG、VEGFA、PPARA、CPT1A, 相关引物序列列表见表7。

表7 引物序列

Table 7 Primer sequences

序号	引物名称		序列(5'-3')	产物长度/bp
1	TNF	上游	GGTCCCAGCTTAGGTTTCATCAG	95
		下游	ATACGGCCAAATCCGTTTAC	
2	PPARG	上游	ACCCTCACACTCACAACCAC	94
		下游	CCTTGAGATCCATGCCGTGG	
3	VEGFA	上游	CTCCAAGAATACCAAAGTGCGA	82
		下游	GCCTGTTGTAGAGCTGGGTC	
4	PPARA	上游	AGCAGATGTGAATGCAGACCAA	100
		下游	GGGATTCTTGGCGTTTCGT	
5	CPT1A	上游	TTCTCAGTCCATCGGTGAGG	113
		下游	CTGGAGAGAGGGTGTCTGTGAT	
6	GAPDH	上游	ACTGTACGCTOCTGCACTAC	80
		下游	AACCTCTGCTCTGCCGTG	

如图10a~10c所示, 在50 μmol/L的槲皮素、山奈酚、异鼠李素作用下, 3T3-L1脂肪细胞中 *PPARG*、*TNF*、*VEGFA* mRNA 的表达水平显著下降。值得注意的是, 随着异鼠李素浓度的增加, 相关靶点的作用强度也随之增强。此外, 如图10d和10e所示, 经过不同的处理后, 3T3-L1脂肪细胞中 *PPARA* 和 *CPT1A* mRNA 的表达水平呈显著上升, 说明辣木叶黄酮能够激活 *PPARA*/*CPT1A* 信号通路。

3 讨论

高脂血症是一种脂质代谢紊乱疾病, 很容易诱发心血管疾病, 如动脉粥样硬化和冠心病。由于不健康的生活方式, 高脂血症及其并发症的发病率和死亡率迅速增加, 严重影响了人类的生活质量。因此, 成功管理和早期治疗高脂血症对于预防此类风险至关重要。由于长期服用化学合成药物易产生副作用, 研究工作越来越集中于开发和利用天然产物来治疗高脂血症。本研究通过网络药

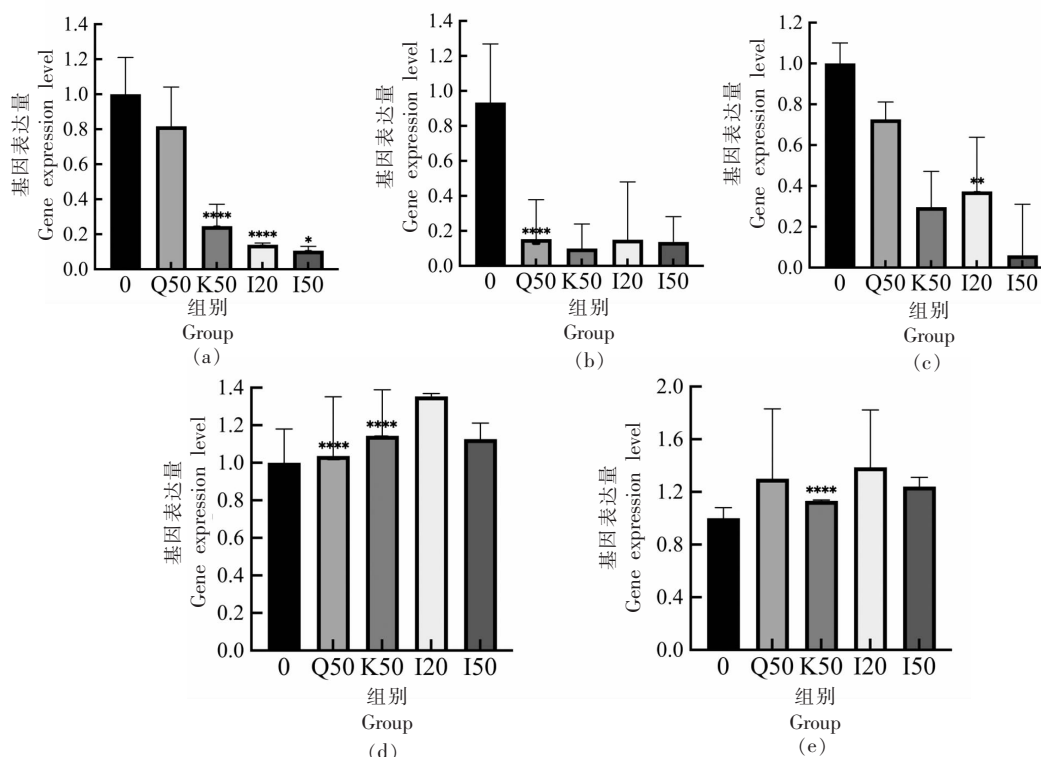


图 10 辣木叶黄酮(槲皮素、山奈酚、异鼠李素)对 3T3-L1 脂肪细胞中 *PPARG*(a)、*TNF*(b)、*VEGFA*(c)、*PPARA*(d)、*CPT1A*(e)mRNA 表达水平的影响

Fig.10 Effects of flavonoids from *Moringa oleifera* leaves (quercetin, kaempferol, isorhamnosum) on mRNA expression levels of *PPARG* (a), *TNF* (b), *VEGFA* (c), *PPARA* (d), and *CPT1A* (e) in 3T3-L1 adipocytes

理学方法对辣木叶中的天然产物在抗高血脂症的物质基础、作用靶点以及信号通路等方面进行初步探究,并通过分子对接试验、细胞试验以及分子试验对预测结果进行验证。

根据辣木叶活性成分与高血脂症疾病的交集靶点构建的 PPI 网络,发现 ALB、TNF、PPARG、PPARA、VEGFA、EGFR 等靶点在辣木叶干预高血脂症的生物过程中可能起关键作用。白蛋白(ALB)是人类血液中最丰富的蛋白质之一,具有调节血浆胶体渗透压的功能,同时也是内源性分子(如激素、脂肪酸和代谢物)以及外源性药物的理想载体蛋白质^[24]。肿瘤坏死因子(TNF)参与调节细胞增殖、分化、脂质代谢等,其水平升高会促进包括肥胖症在内的代谢性疾病的脂肪分解^[25]。核激素受体 PPAR γ (PPARG)和 PPAR α (PPARA)作为编码过氧化物酶体增殖剂激活受体亚家族核受体的成员(PPARs),是脂肪形成的关键调节因子^[26]。激活 PPARA 受体后,直接转录调控下游参

与 β -氧化通路、FA 摄取和 TG 分解代谢的基因,从而对细胞内脂质和碳水化合物代谢产生影响,成为调节脂质代谢的关键机制^[27]。血管内皮生长因子 A(VEGFA)在调节脂肪组织中血管生成中起关键作用^[28]。表皮生长因子受体生长因子受体(EGFR)在细胞增殖、分化和迁移中起着重要作用^[29]。

KEGG 分析结果显示多条信号通路与高血脂症密切相关,其中包括化学致癌-受体激活、糖尿病并发症中的 AGE-RAGE 信号通路、脂质与动脉粥样硬化、PPAR 信号通路、胰岛素抵抗、HIF-1 信号通路等。其中 PPAR 信号通路通过参与胆固醇的合成与分解、脂肪酸氧化等多种生物学过程,维持脂质代谢的动态平衡,从而调节血脂水平^[30]。HIF-1 信号通路诱导参与脂肪酸摄取、合成和储存的基因的表达,降低脂肪酸的分解代谢,导致缺氧和脂肪组织中脂肪酸的进一步积累^[31]。辣木叶可能通过调节多种信号通路的作用来缓解高血脂症。

分子对接验证中选取网络药理学预测的 15 个辣木叶活性成分与 PPI 网络中 6 个高血脂症关键靶点蛋白进行对接, 结果表明辣木叶主要活性成分与核心靶点有强烈的结合活性。此外, 黄酮类单体槲皮素、木犀草苷和芹菜素等具有丰富的氢键受体和供体, 能够与靶点蛋白形成稳定的氢键, 从而实现小分子化合物在蛋白活性位点的稳定结合^[19]。

试验结果表明, 辣木叶黄酮(槲皮素、山奈酚、异鼠李素)具有抑制 3T3-L1 前脂肪细胞增殖和分化的能力, 同时减少了脂质在脂肪细胞分化过程中的积累。此外, 分子试验结果显示, 辣木叶中黄酮(槲皮素、山奈酚、异鼠李素)可能通过对 3T3-L1 脂肪细胞中 PPAR γ 、VEGFA、TNF 靶点的下调, 以及对 PPAR α /CPT1A 信号通路的激活, 影响细胞成脂分化过程, 调节胆固醇代谢, 从而维持脂代谢平衡。

本试验运用网络药理学和分子对接理论上确定了辣木叶抗高血脂症的有效作用成分、作用靶点及作用通路, 并通过细胞试验说明辣木叶黄酮类对缓解高血脂症有一定的作用, 接下来将通过体外细胞试验等来进一步确定筛选出的活性成分、靶点以及通路能否发挥作用, 以及如何发挥作用, 并尽可能开发辣木叶的各种潜在食用和药用价值, 为新药研发奠定基础。

参 考 文 献

- [1] Non-Communicable Disease Risk Factor Collaboration. Repositioning of the global epicentre of non-optimal cholesterol[J]. *Nature*, 2020, 582(7810): 73-77.
- [2] EL-TANTAWY W H, TEMRAZ A. Natural products for controlling hyperlipidemia: Review[J]. *Archives of Physiology and Biochemistry*, 2019, 125(2): 128-135.
- [3] HAMDY W E, ABEER T. Natural products for controlling hyperlipidemia: Review [J]. *Archives of Physiology and Biochemistry*, 2018, 125(2): 128-135.
- [4] ANWARN F, LATIF S, ASHRAF M, et al. *Moringa oleifera*: A food plant with multiple medicinal uses[J]. *Phytotherapy Research*, 2007, 21(1): 17-25.
- [5] 刘凤霞, 王苗苗, 赵有为, 等. 辣木中功能性成分提取及产品开发生的研究进展[J]. *食品科学*, 2015, 36(19): 282-286.
LIU F X, WANG M M, ZHAO Y W, et al. Extraction of functional components from *Moringa oleifera* and development of *Moringa oleifera*-based products[J]. *Food Science*, 2015, 36(19): 282-286.
- [6] SIDDHURAJU P, BECKER K. Antioxidant properties of various solvent extracts of total phenolic constituents from three different agroclimatic origins of drumstick tree (*Moringa oleifera* Lam.) leaves [J]. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 2003, 51(8): 2144.
- [7] ZHAO C, HANG F L, CHONG Y G, et al. *Moringa oleifera* leaf polysaccharide regulates fecal microbiota and colonic transcriptome in calves[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2023, 253(P6): 127108.
- [8] FAIZI S, SIDDIQUI B S, SALEEM R, et al. Isolation and structure elucidation of novel hypotensive agents, niazinin A, niazinin B, niazimicin and niaziminin A + B from *Moringa oleifera*: The first naturally occurring thiocarbamates [J]. *ChemInform*, 1993, 24(14): 3237-3241.
- [9] WATERMAN C, CHENG D M, ROJAS-SILVA P, et al. Stable, water extractable isothiocyanates from *Moringa oleifera* leaves attenuate flagellate *in vivo* [J]. *Phytochemistry*, 2014, 7(103): 114-122.
- [10] XU Y B, CHEN G L, GUO M Q. Antioxidant and anti-inflammatory activities of the crude extracts of *Moringa oleifera* from Kenya and their correlations with flavonoids[J]. *Antioxidants*, 2019, 8(8): 296.
- [11] CHEN G L, XU Y B, WU J L, et al. Hypoglycemic and hypolipidemic effects of *Moringa oleifera* leaves and their functional chemical constituents[J]. *Food Chemistry*, 2020, 333: 127478.
- [12] MITTAL A, SHARMA M, DAVID A, et al. An experimental study to evaluate the anti-inflammatory effect of *Moringa oleifera* leaves in animal models[J]. *International Journal of Basic & Clinical Pharmacology*, 2017, 6(2): 452.
- [13] LAE I J, HYE J L, CHAN S K. A potential oral anticancer drug candidate, *Moringa oleifera* leaf extract, induces the apoptosis of human hepatocellular carcinoma cells[J]. *Oncology Letters*, 2015, 10(3): 1597-1604.

- [14] 沙子珺, 黎彩凤, 唐仕欢, 等. 新资源药材辣木叶抗高血脂症的药效与作用机制探析[J]. 中国中药杂志, 2021, 46(14): 3465–3477.
SHA Z J, LI C F, TANG S H, et al. Efficacy and mechanism of new resource medicinal materia *Moringa oleifera* leaves against hyperlipidemia [J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2021, 46(14): 3465–3477.
- [15] 黄友, 杨莎莎, 林夏, 等. 基于网络药理-分子对接研究附子理中丸治疗溃疡性结肠炎的作用机制[J]. 药学报, 2020, 55(8): 1812–1822.
HUANG Y, YANG S S, LIN X, et al. The mechanism of action of Fuzi-Lizhong pill in treatment of ulcerative colitis based on network pharmacology – molecular docking [J]. Acta Pharmaceutica Sinica, 2020, 55(8): 1812–1822.
- [16] 陈学麟, 胡剑卓, 陶灵霞. 基于网络药理学和分子对接的黄蜀葵花干预糖尿病肾病的作用机制研究[J]. 现代药物与临床, 2022, 37(2): 252–263.
CHEN X L, HU J Z, TAO L X. Based on the network pharmacology and molecular docking method to explore the mechanism of flowers of *Abelmoschus manihot* in the intervention of diabetic kidney disease[J]. Drugs & Clinic, 2022, 37(2): 252–263.
- [17] 许泽恭, 祝晨蓓, 周玖瑶, 等. 基于网络药理学和分子对接探究罗布麻叶抗高血脂症的作用机制[J]. 中药新药与临床药理, 2021, 32(8): 1154–1163.
XU Z G, ZHU C C, ZHOU J Y, et al. Mechanism exploration of *Apocynum venetum* L. leaves in treatment of hyperlipidemia based on network pharmacology and molecular docking[J]. Traditional Chinese Drug Research and Clinical Pharmacology, 2021, 32(8): 1154–1163.
- [18] 但文超, 何庆勇, 曲艺, 等. 基于网络药理学的枳术丸调治血脂异常的分子机制研究[J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2019, 21(11): 2396–2405.
DAN W C, HE Q Y, QU Y, et al. Molecular mechanism of ZHIZHU pill in treatment of dyslipidemia based on network pharmacology[J]. Modernization of Traditional Chinese Medicine and Materia Medica-World Science and Technology, 2019, 21(11): 2396–2405.
- [19] 金渭荃. 基于网络药理学与分子对接研究刺山柑果实提取物对类风湿性关节炎的作用机制[D]. 乌鲁木齐: 新疆农业大学, 2022.
JIN W Q. Mechanism of caper fruit extracts on of the fruit of *Capparis spinosa* L. rheumatoid arthritis based on network pharmacology and molecular docking[D]. Urumqi: Xinjiang Agricultural University, 2022.
- [20] 张梦, 王欣玲. 基于网络药理学探究银杏叶治疗非动脉炎性前部缺血性视神经病变的机制[J]. 眼科新进展, 2021, 41(11): 1037–1042.
ZHANG M, WANG X L. Effect of *Ginkgo biloba* in the treatment of non-arteritic anterior ischemic optic neuropathy based on network pharmacology[J]. Recent Advances in Ophthalmology, 2021, 41(11): 1037–1042.
- [21] 原茵, 吴紫璇, 郭亚萍, 等. 基于网络药理学与分子对接探讨五苓散治疗脂代谢疾病的作用机制[J]. 中药新药与临床药理, 2022, 33(6): 794–803.
YUAN Y, WU Z X, GUO Y P, et al. Study on the mechanism of wuling powder in the treatment of lipid metabolic diseases based on network pharmacology and molecular docking[J]. Traditional Chinese Drug Research and Clinical Pharmacology, 2022, 33(6): 794–803.
- [22] OON S F, NALLAPPAN M, KASSIM N K, et al. Hypolipidemic activities of xanthorrhizol purified from centrifugal TLC[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2016, 478(3): 1403–1408.
- [23] 卜素, 薛泉, 袁春颖, 等. 银杏叶提取物中三种黄酮对 3T3-L1 细胞成脂代谢的影响[J]. 山东农业大学学报(自然科学版), 2020, 51(4): 598–604.
BU S, XUE Q, YUAN C Y, et al. Effects of three flavonoids extracted from *Ginkgo biloba* on lipid metabolism in 3T3-L1 cells [J]. Journal of Shandong Agricultural University (Natural Science Edition), 2020, 51(4): 598–604.
- [24] 柳杨青, 汪艳芳, 郭丽君. 2 型糖尿病患者血清白蛋白水平变化及影响因素分析[J]. 中华实用诊断与治疗杂志, 2019, 33(11): 1085–1088.
LIU Y Q, WANG Y F, GUO L J. Changes of serum albumin concentration in type 2 diabetes mellitus and the influencing factors [J]. Journal of Chinese Practical Diagnosis and Therapy, 2019, 33(11): 1085–1088.
- [25] XIA W Y, ZHOU Y, WANG L J, et al. Tauroursodeoxycholic acid inhibits TNF- α -induced lipolysis in 3T3-L1 adipocytes via the IRE-1/JNK-perilipin-A signaling pathway[J]. Molecular Medicine Reports, 2017, 4: 1753–1758.

- [26] FUENTES E, PALOMO I. Mechanism of antiplatelet action of hypolipidemic, antidiabetic and antihypertensive drugs by PPAR activation[J]. *Vascular Pharmacology*, 2014, 62(3): 162–166.
- [27] 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): 1–10.
- WU Y B, ZHOU X Q, YAN D M, et al. Research progress of active components of traditional Chinese medicine in treatment of hyperlipidemia by activating PPAR α pathway[J]. *Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae*, 2023, 29(11): 1–10.
- [28] FATIMA L A, CAMPHELLO R S, SANTOS R S, et al. Estrogen receptor 1 (ESR1) regulates VEGFA in adipose tissue[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7(1): 16716.
- [29] BOYER M M. Relative contributions of the neurosensory retina and retinal pigment epithelium to macular hypofluorescence[J]. *Archives of Ophthalmology*, 2000, 118(1): 27.
- [30] 裴帅, 曹宁宁, 李晓璇, 等. 中药干预高脂血症相关信号通路的研究进展[J]. *药物评价研究*, 2022, 45(1): 177–185.
- PEI S, CAO N N, LI X X, et al. Research progress of traditional Chinese medicine intervention on signaling pathway associated with hyperlipidemia [J]. *Drug Evaluation Research*, 2022, 45(1): 177–185.
- [31] LI S H, WANG Z Z, ZHOU Z N, et al. Molecular mechanism of the role of apigenin in the treatment of hyperlipidemia: A network pharmacology approach [J]. *Chemistry & Biodiversity*, 2023, 20(2): e202200308.

Studies on *Moringa oleifera* Leaves Components against Hyperlipidemia through Network Pharmacology and Cell Model

ZHENG Yueyan, ZHANG Ziyang, ZHOU Su, YAN Xiaoxue, LU Baiyi, JIANG Yihong*
(College of Biosystems Engineering and Food Science, Zhejiang University, Hangzhou 310058)

Abstract Objective: To explore the active compounds and integrative mechanism of *Moringa oleifera* leaves in the treatment of hyperlipidemia based on network pharmacology. Methods: The chemical components of *Moringa oleifera* leaves were obtained through literature mining and CNKI. Hyperlipidemia targets were obtained via Gencards, OMIM, and DrugBank and protein interaction analysis was carried out by String. Metascape was used to perform GO and KEGG analysis. Finally, the molecular docking was performed by AutoDock Vina; experimental validation was performed by MTT, oil red O staining, and qRT-PCR on 3T3-L1 cells. Results: The core ingredients of *Moringa oleifera* leaves were sinapinic acid, palmitic acid, naringenin, etc. The core targets were ALB, TNF, PPARG, PPARA, VEGFA, etc. The signaling pathways included AGE-RAGE and PPAR signaling pathway, lipid, and atherosclerosis, etc. The molecular docking indicated strong binding activities. The experiments of 3T3-L1 cells showed that the toxicity of flavonoids to cells was significant at high concentrations (50–100 $\mu\text{mol/L}$), the fat content decreased by 8.45%, 16.28%, and 31.33%, respectively, after the intervention. PPARG, VEGFA, and TNF expression decreased and PPARA/CPT1A signaling pathway significantly increased after the intervention. Conclusion: Network pharmacology was used to predict the compounds and mechanism in *Moringa oleifera* against hyperlipidemia, which were confirmed by molecular docking and cellular assays, suggesting that *Moringa oleifera* leaves could be a potential therapeutic compound for reducing intracellular lipid levels.

Keywords *Moringa oleifera* leaves; hyperlipidemia; network pharmacology; molecular docking; 3T3-L1 cells