

基于网络药理学探讨银杏叶提取物通过激活 PPAR γ 治疗动脉粥样硬化的机制

王子元¹, 陶 惠¹, 肖映雪², 殷志琦^{1*}

(¹ 中国药科大学中药学院中药制药系, 南京 211198; ² 中国药科大学中药学院天然药物化学系, 南京 211198)

摘 要 探讨银杏叶提取物 (*Ginkgo biloba* extract, GBE) 对高脂饮食诱导的 ApoE^{-/-}小鼠动脉粥样硬化疾病 (atherosclerosis, AS) 的影响和作用机制。ApoE^{-/-}小鼠灌胃给予低、高剂量 GBE [50、150 mg/(kg·d)], 9 周后检测小鼠血脂水平, 主动脉斑块脂质沉积情况、坏死核心面积和血管炎症水平。利用 TCMSP、Swiss Target Prediction、Genecards 等公共数据库预测 GBE 治疗 AS 的潜在靶点, 通过 GO 和 KEGG 富集分析寻找其药效发挥的可能机制。在细胞水平上, 氧化低密度脂蛋白 (oxidized low density lipoprotein, oxLDL) 处理 THP-1 形成泡沫细胞进行实验, 使用油红 O 染色检测脂质蓄积情况, Dil-oxLDL 检测泡沫细胞生成, 使用 RT-qPCR 检测胆固醇摄取和外排受体的 mRNA 变化情况。最后, 使用 Western blot、免疫荧光等检测 GBE 对核心靶点过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (peroxisome proliferators-activated receptors- γ , PPAR γ) 表达情况的影响。结果显示, GBE 可以减少小鼠主动脉脂质沉积和坏死核心面积, 降低血清脂质和炎症水平。在体外减少巨噬细胞胆固醇摄取、增加胆固醇外排。本研究表明, GBE 可以通过增强 PPAR γ 的表达减少泡沫细胞的生成, 抑制主动脉胆固醇蓄积和斑块的形成, 缓解 AS。

关键词 银杏叶提取物; 动脉粥样硬化; 泡沫细胞; PPAR γ

中图分类号 R965 **文献标志码** A **文章编号** 1000-5048(2025)02-0225-11

doi: 10.11665/j.issn.1000-5048.2024032301

引用本文 王子元, 陶惠, 肖映雪, 等. 基于网络药理学探讨银杏叶提取物通过激活 PPAR γ 治疗动脉粥样硬化的机制 [J]. 中国药科大学学报, 2025, 56(2): 225–235.

Cite this article as: WANG Ziyuan, TAO Hui, XIAO Yingxue, *et al.* Network pharmacology-based study of the mechanism of *Ginkgo biloba* extract (GBE) in the treatment of atherosclerosis by activating PPAR γ [J]. *J China Pharm Univ*, 2025, 56(2): 225–235.

Network pharmacology-based study of the mechanism of *Ginkgo biloba* extract (GBE) in the treatment of atherosclerosis by activating PPAR γ

WANG Ziyuan¹, TAO Hui¹, XIAO Yingxue², YIN Zhiqi^{1*}

¹Department of TCMs Pharmaceuticals, School of Traditional Chinese Pharmacy, China Pharmaceutical University, Nanjing 211198; ²Department of Natural Medicinal Chemistry, School of Traditional Chinese Pharmacy, China Pharmaceutical University, Nanjing 211198, China

Abstract To investigate the effect of *Ginkgo biloba* extract (GBE) on lipids accumulation and the progression of atherosclerosis(AS), ApoE^{-/-} mice fed with HFD were injected i.g. with two different doses of GBE (GBE-L 50 mg/(kg·d) or GBE-H 150 mg/(kg·d)) for 9 weeks. The core targets and potential mechanisms of GBE therapy for AS were investigated using network pharmacological target prediction. Subsequently, oxidized low-density lipoprotein (ox-LDL)-induced THP-1 was used to investigate the effect of GBE on foam cell formation through oil red staining and Dil-oxLDL fluorescent staining. The mRNA alterations in cholesterol uptake and efflux receptors were detected by real-time quantitative PCR. Finally, the impact of GBE on the expression of PPAR γ as the core target was assessed through Western blot and immunofluorescence. It was found that GBE improved serum lipid profile, reduced necrotic cores and lipid deposition in aortic root plaques, and decreased the level of inflammatory factors in serum of ApoE^{-/-} mice. Moreover, GBE treatment reduced the level of intracellular lipid

accumulation and inhibited cholesterol uptake and efflux to alleviate foam cell formation. GBE activated PPAR γ to enhance ABCA1/ABCG1-induced cholesterol efflux in THP-1. These results suggest that GBE can suppress lipid accumulation and alleviate foam cell formation by activating PPAR γ pathway.

Key words *Ginkgo biloba* extract; atherosclerosis; foam cell; PPAR γ

动脉粥样硬化 (atherosclerosis, AS) 是一种脂质斑块在中、大动脉壁上积聚, 导致血流减少或阻塞的疾病, 是多种心血管疾病的发病基础^[1]。AS 早期, 在血流动力学的作用下血管内皮发生损伤引起血液中的低密度脂蛋白 (low-density lipoprotein, LDL) 进入内膜下空间形成氧化低密度脂蛋白 (oxidized low-density lipoprotein, oxLDL), oxLDL 刺激血管内皮引起单核细胞招募进入内膜下空间并诱导其分化为巨噬细胞, 随后巨噬细胞吞噬积聚的 oxLDL 最终形成泡沫细胞^[2]。泡沫细胞的形成是 AS 的重要标志, 其形成的主要原因是胆固醇酯在胞内过度蓄积。胆固醇外排是将泡沫细胞中蓄积的胆固醇酯水解为游离胆固醇后, 通过水扩散或膜转运体介导的方式将游离胆固醇外排到胞外的过程^[3]。外排的胆固醇会通过胆固醇逆向转运 (reverse cholesterol transport, RCT) 至肝脏完成降解。因此, 增强胆固醇外排被认为是缓解胆固醇酯过度蓄积, 抑制泡沫细胞生成的重要手段^[4]。

前人研究发现, 在泡沫细胞生成前后, 细胞内胆固醇外排速率的改变是膜转运体介导的胆固醇外排能力下降导致的, 因此, 增强膜转运体介导的胆固醇外排, 恢复胆固醇的胞内稳态是减少泡沫细胞生成的可行策略^[5]。ATP 结合盒转运体 A1 (ATP-binding cassette transporter A1, ABCA1) 与 ATP 结合盒亚家族 G 成员 1 (ATP-binding cassette subfamily G member 1, ABCG1) 同属于 ABC 转运蛋白超家族, 该转运蛋白家族可以利用 ATP 作为能量来源跨细胞膜运输各种底物, 以保护生物体免受外源物 (例如 oxLDL) 的侵害。研究表明, 通过在 THP-1 和 MPMs 诱导生成泡沫细胞中对 ABCG1 和 ABCA1 介导的胆固醇流出量进行检测, 结果显示 ABCG1 和 ABCA1 介导的胆固醇流出量约占膜转运体介导总胆固醇流出量的 70%^[6]。已有研究发现, ABCG1 会将胆固醇酯外排至高密度脂蛋白 (high-density lipoprotein, HDL), 而 ABCA1 可以增强 HDL 合成, 进而加速 RCT 过程从而促进 ABCG1 介导的胆固醇外排。动物水平实验表明, 在 ApoE^{-/-}小鼠中敲除 ABCA1, 则在小鼠血液

中几乎检测不到 HDL, 而在 ApoE^{-/-}小鼠中敲除 ABCG1 会引起多个器官的脂质蓄积, 但对 LDL-C、HDL 等血脂水平没有显著影响^[7]。与仅敲除 ABCA1 或 ABCG1 相比, 在 ApoE^{-/-}小鼠中同时敲除 ABCA1 和 ABCG1, 主动脉病变发展速度明显加快, 主动脉斑块面积显著上升^[8]。这些研究结果说明, ABCA1 和 ABCG1 在胆固醇外排中发挥着重要的协同作用, 增强 ABCA1 和 ABCG1 的表达是缓解泡沫细胞生成的有效策略^[6]。

银杏叶提取物 (*Ginkgo biloba* extract, GBE) 作为一种预防和治疗心血管疾病的药物受到广泛关注。研究报道, GBE 具有多种黄酮类和萜类成分如银杏内酯 A、银杏内酯 B、槲皮素等^[9], 具有抗炎、抗氧化和改善肠道菌群结构等多重药理作用, 有助于改善 AS^[10]。前人研究发现, GBE 可以抑制 oxLDL 诱导的内皮细胞分泌黏附因子, 减少 AS 的内皮炎症, 同时 GBE 可以通过抑制血管内皮生长因子减少巨噬细胞来源的泡沫细胞生成^[11]。在平滑肌细胞来源的泡沫细胞中, GBE 能减少胆固醇摄取, 增强胆固醇外排^[12]。然而, GBE 是否能通过调节脂质稳态缓解巨噬细胞来源泡沫细胞生成, 目前尚不清楚。

因此, 本研究首先利用高脂饮食诱导 ApoE^{-/-}小鼠建立 AS 动物模型考察 GBE 对小鼠主动脉斑块面积和血脂水平的影响; 其次使用多种公共数据库联合分析 GBE 改善 AS 的潜在机制; 最后采用 oxLDL 诱导 THP-1 细胞建立体外泡沫细胞模型探讨 GBE 治疗 AS 是否与增强 PPAR γ 表达, 促进胆固醇外排, 减少泡沫细胞生成有关。本研究通过网络药理学技术联合体内体外药效验证和机制探索, 寻找 GBE 发挥抗 AS 作用的可能机制, 为 GBE 的临床适应证的拓展提供理论依据。

1 材料

1.1 试剂

银杏叶提取物 (GBE, 万邦德制药集团有限公司); 阿托伐他汀钙片 (美国辉瑞制药有限公司); TP26302050 型高脂饲料 (南通特洛菲有限公司, 脂

肪 42%, 蛋白质 15%, 碳水化合物 42.5%, 胆固醇含量 0.5%); TP 26332 型对照饲料 (南通特洛菲有限公司, 脂肪 10%, 蛋白质 14%, 碳水化合物 76%, 胆固醇含量 0%); 小鼠 TC、TG、HDL-C、LDL-C 检测试剂盒 (南京建成生物工程研究所); 白介素-1 β (IL-1 β)、白介素-6 (IL-6)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α) ELISA 检测试剂盒 (杭州联科生物科技有限公司); 佛波酯 (phorbol myristate acetate, PMA, 美国 MCE 公司); 氧化低密度脂蛋白 (oxLDL)、荧光氧化低密度脂蛋白 (Dil-oxLDL) (广州奕元生物科技有限公司); CCK-8 检测试剂盒 (杭州孚德生物科技有限公司); PCR 逆转录扩增试剂盒 (江苏愚公生命生物科技有限公司); PPAR γ 抗体 (亲科生物科技有限公司)。

1.2 仪器

超速控温离心机 (美国 Beckman Coulter 公司); 多功能酶标仪 (美国 BioTek 公司); 倒置荧光显微镜 (麦克奥迪实业集团有限公司); 逆转录仪、Western blot 系统 (美国 Bio-Rad 公司); 实时定量荧光 PCR 仪 (美国 Life Technologies 公司); 多功能成像仪 (美国 Sapphire 公司); 生物安全柜 (新加坡 Esco 公司)。

1.3 细胞与动物

人急性白血病单核细胞 (THP-1, 购自 ATCC); ApoE^{-/-}小鼠 (雄性, 20 只, 8 周龄) 和 C57BL/6J 小鼠 (雄性, 5 只, 8 周龄) 购自南京集萃药康生物科技有限公司。所有动物试验程序经江苏省中医药科学院动物研究伦理委员会批准, 许可号: AEWC-20220401-200。

2 方法

2.1 动物分组与给药

将 C57BL/6J 小鼠与 ApoE^{-/-}小鼠以普通饲料适应性喂养 1 周后, 5 只 C57BL/6J 小鼠继续以 TP 26332 型对照饲料喂养; 20 只 ApoE^{-/-}小鼠按体重随机分为 4 组 (模型组, 银杏叶提取物低剂量组 GBE-L 组, 银杏叶提取物高剂量组 GBE-H 组, 阿托伐他汀组 ATO 组), 每组给予 TP 26302050 高脂饲料喂养。模型组灌胃 0.5% CMC-Na 溶液; GBE-L 组与 GBE-H 组每日分别灌胃 50、150 mg/kg GBE (溶于 0.5% CMC-Na 溶液); 阿托伐他汀组每日灌胃 10 mg/kg ATO (溶于 0.5% CMC-Na 溶液), 连续给药 9 周。实验终点时, 对小鼠采取腹腔注射 1% 戊巴

比妥钠 (0.1 mL/10 g) 的麻醉剂, 待翻正反射消失后, 采集小鼠的血液, 收集心脏与主动脉并用 4% 多聚甲醛固定。

2.2 细胞培养与给药

使用添加 10% FBS 的 RPMI-1640 培养基培养 THP-1 细胞, 培养环境为 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂。根据实验需求接种在对应的细胞培养板中, 并加入 100 ng/mL PMA, 诱导分化 24 h 后, 进行后续实验。

对诱导成功的 THP-1 来源巨噬细胞按照以下分组进行给药: 正常对照组, 模型组 (80 μ g/mL oxLDL), 银杏叶提取物低剂量组 (GBE-L 组, 80 μ g/mL oxLDL+20 μ g/mL GBE), 银杏叶提取物高剂量组 (GBE-H 组, 80 μ g/mL oxLDL+60 μ g/mL GBE), 阿托伐他汀组 (ATO 组, 80 μ g/mL oxLDL+1 μ mol/L ATO)。给药 24 h 后, 进行后续试验检测。

2.3 血清生化指标检测

按照试剂盒说明书所述检测“2.1”项血清样本进行血清总胆固醇 (TC)、甘油三酯 (TG)、高密度脂蛋白 (HDL-C) 和低密度脂蛋白 (LDL-C) 的水平。

2.4 血清炎症因子指标检测

按照 ELISA 试剂盒说明书所述检测“2.1”项血清样本中 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 的水平。

2.5 主动脉 H&E 染色

取固定的心脏组织使用梯度脱水法对样本进行脱水包埋, 并切成 5 μ m 厚度的切片, 将切片放入二甲苯中脱蜡处理 15 min 后, 放入无水乙醇中孵育 10 min, 完全洗脱二甲苯, 按照 95%、85%、70% 乙醇梯度分别洗脱 5 min, 放入纯水中浸泡。按照 H&E 染色试剂盒所述, 进行 H&E 染色。染色结束后, 使用中性树胶封片并风干, 放在显微镜下观察并拍照。

2.6 主动脉 Masson 染色

取心脏主动脉切片, 按照 Masson 三色染色试剂盒所述, 进行 Masson 染色。染色结束后, 使用中性树胶封片并风干, 放在显微镜下观察并拍照。

2.7 主动脉油红 O 染色

取固定的心脏组织, 使用 15%~30% 梯度蔗糖溶液脱水后, 加入 OCT 包埋剂并放入盛有液氮的容器中, 液氮气化沸腾 20 s 后取出心脏, 使用冰冻切片机切成 8 μ m 的切片。待切片恢复室温后, 加入油红 O 工作液染色 10 min。染色完成后放入 60% 异丙醇透化 10 s, 再放入纯水中浸染 20 s, 最后使用苏木素染液对细胞核进行染色。染色结束后,

滴加甘油-明胶封片, 放于显微镜下观察并拍照。

2.8 CCK-8 法检测细胞活力

取处于对数生长期的 THP-1 细胞, 以 70% 的密度接种于 96 孔板中, 每组设置 3 个复孔, 并按照 0、10、20、30、40、50、60、80、100、150 $\mu\text{g/mL}$ 的 GBE 质量浓度梯度处理细胞 24 h, 处理结束后向每孔加入 CCK-8 溶液 10 μL , 放入细胞培养箱中孵育 1.5 h, 孵育结束后将 96 孔板置酶标仪中, 检测波长 450 nm, 检测吸光度, 计算相对细胞活力。

2.9 细胞油红 O 染色

按照油红 O 染色试剂盒所述, 取油红 O 母液 1.5 mL, 加入双蒸水 1 mL 进行混合, 得到油红 O 工作液, 室温静置 10 min 后进行油红 O 染色。染色完成后, 在吸水纸上弃去染料, 每孔加入 60% 异丙醇 200 μL 透化 5~10 s, 加入蒸馏水清洗 30 s, 吸水

纸吸去蒸馏水, 重新加入蒸馏水放到显微镜下拍照观察。

2.10 实时定量荧光 PCR (RT-qPCR)

将完成给药处理的细胞样本, 使用 Trizol-氯仿-异丙醇法提取 RNA, 测定浓度后, 按照逆转录试剂盒所述配制反应体系, 即每孔中加入 RNA 1000 ng, 逆转录预混液 4 μL , dsDNase 1 μL , 最后加入无核酶水至 20 μL 。充分混匀后放入逆转录仪中, 进行逆转录实验。反应结束后, 进行 qPCR 扩增实验。

按照 Taq SYBR Green mix 10 μL , 正向引物 0.4 μL , 反向引物 0.4 μL , cDNA 2 μL , 无核酶水 7.2 μL 配制反应体, 按照试剂盒所述方法进行 qPCR 仪程序设置。反应结束后导出 CT, 使用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法计算各基因表达情况。各基因引物序列见表 1 所示。

Table 1 Primer sequences used for quantitative real-time PCR

Gene	Species	Forward	Reverse
SR-A1	Human	AAAGAAGAACAAGCGCACGTGG	GAGCACCAGGTGGACCAGTTTG
CD36	Human	TCCTATTGGCCAAGCTATTGCG	CACGGGGATTCTTTAAGGTCG
ABCA1	Human	CGTTTCCGGGAAGTGTCTTA	GCTAGAGATGACAAGGAGGATGGA
ABCG1	Human	GGGAAGTTGATAAAGGATGT	GATTCGGGCTATGTATGG
GAPDH	Human	GGAGCGAGATCCCTCCAAAT	GGCTGTTGTCATACTTCTCATGG
PPAR γ	Human	GGAAGACCACTCGCATTCCTT	GTAATCAGCAACCATTGGGTCA

2.11 银杏叶提取物活性成分及靶基因筛选

使用中药系统药理学数据库与分析平台 TCMSP 数据库 (<https://old.tcmsp-e.com/tcmsp.php>) 检索银杏叶中有效成分 (以 OB $\geq$ 30%、DL $\geq$ 0.18 为条件进行筛选)。使用 Swiss Target Prediction 对所筛选成分作用靶点进行预测 (<http://www.swisstargetprediction.ch/>), 以 probability $\geq$ 0.1 为条件将得到的所有靶点进行整合去重, 使用 Uniprot 数据库 (<https://beta.uniprot.org/>) 将所得靶点蛋白名称转换为相对应基因名。

2.12 AS 疾病靶点获取

使用 DisGeNET 网站 (<https://www.disgenet.org/>), Score $\geq$ 中位数 0.02)、GeneCards 数据库 (<https://www.genecards.org>, score $\geq$ 中位数 1.44)、OMIM 数据库 (<https://omim.org>, 选择 approved symbol) 筛选疾病靶点, 并进行整合去重。

2.13 “药物活性成分-靶基因”核心靶点网络构建

使用 Venny 2.1.0 (<https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>) 对疾病和活性成分的作用靶

点进行 Venny 图绘制, 所得交集即为活性成分与疾病共同靶点。使用 String 数据库 (<https://cn.string-db.org>) 对共同靶点进行蛋白互作分析, 并将结果导出至 Cytoscape 3.9.0 软件中, 使用 Analyze Network 绘制 GBE 治疗 AS 的核心靶点筛选, 并使用 CytoNCA 绘制蛋白互作图。

2.14 KEGG 通路富集和 GO 功能富集分析

将“药物活性成分-靶基因”共同作用靶点导入 David 数据库 (<https://david.ncifcrf.gov/home.jsp>) 中, 进行 KEGG 和 GO 富集分析, 并将结果按照 P 大小排列后, 每组选取 P 最小的 10 个进行图像可视化处理, 以气泡图和柱状图绘制 KEGG 和 GO 富集分析图。

2.15 Western blot 蛋白免疫印记

将完成给药处理的细胞样本, 使用 RIPA 裂解法提取蛋白并使用 BCA 法进行蛋白浓度定量, 放入沸水浴加热煮沸 5 min, 使蛋白质充分变性。使用 10% SDS-PAGE 蛋白凝胶电泳对蛋白分离孵育对应一抗后进行检测。

2.16 免疫荧光法检测泡沫细胞 PPAR γ 表达

取心脏主动脉切片, 进行免疫荧光实验。按照抗原修复、封闭、一抗孵育、二抗孵育、DAPI 染色的步骤进行免疫荧光实验, 最后将细胞爬片放置于载玻片上用甘油进行封片后放于荧光显微镜下观察并拍照。

2.17 统计学分析

数据采用 GraphPad Prism 10.0 软件进行单因素方差分析并进行制图。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, $P < 0.05$ 与 $P < 0.01$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 GBE 改善 ApoE $^{-/-}$ 小鼠 AS

为探讨 GBE 能否改善小鼠 AS 进展, 使用 HFD 喂养 ApoE $^{-/-}$ 小鼠, 灌胃给药 GBE-L [50 mg/(kg·d)] 和 GBE-H [150 mg/(kg·d)] 9 周。结果表明, 与对照组相比, 模型组小鼠主动脉出现明显动脉斑块和脂质蓄积, 灌胃给予 GBE 可以显著缓解小鼠主动脉中斑块面积和脂质蓄积水平 (图 1-A)。血脂异常是诱发 AS 的重要风险因素^[13]。因此, 检测了小鼠血清内的脂质水平。结果显示, 与模型组相

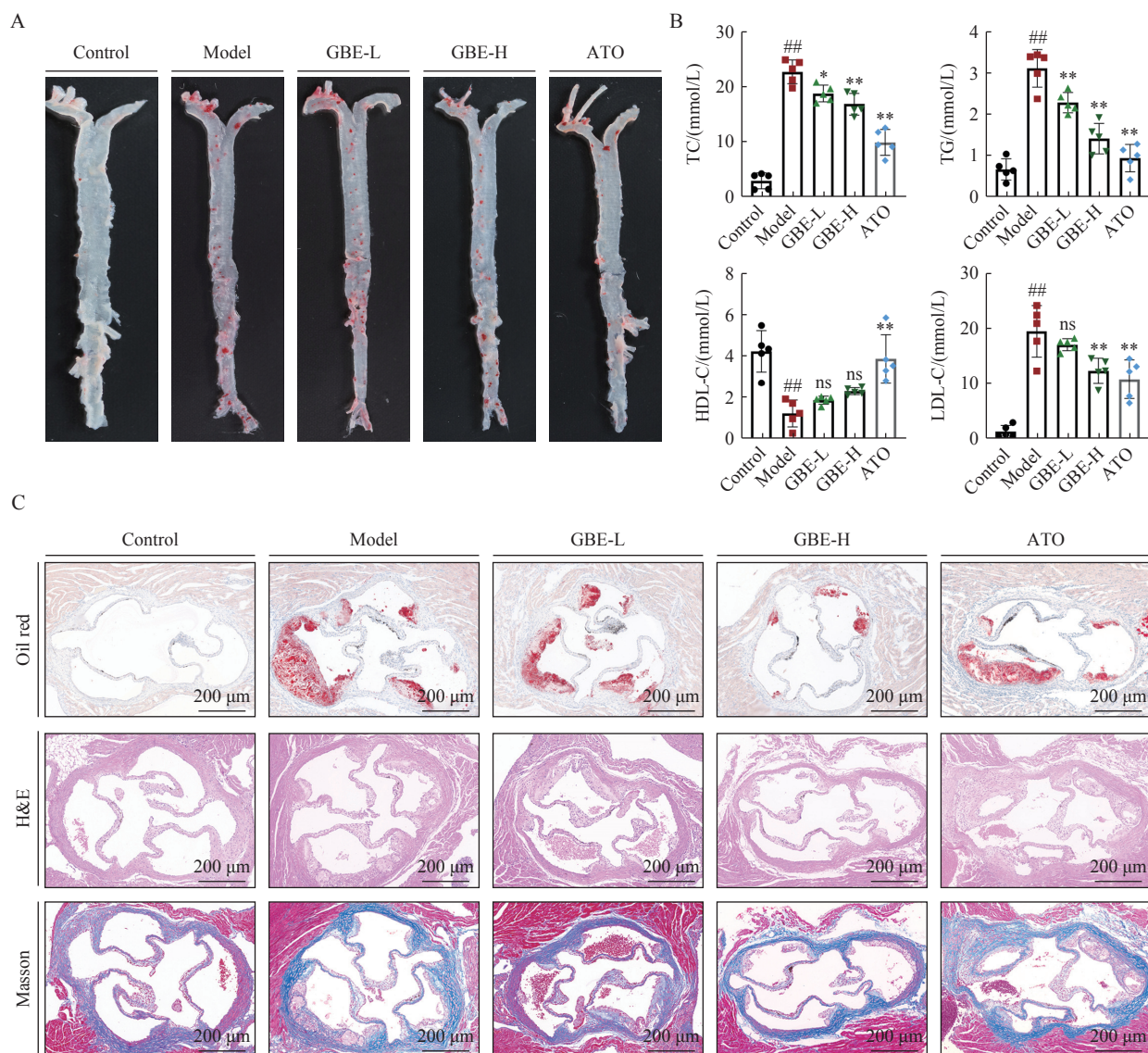


Figure 1 *Ginkgo biloba* extract (GBE) attenuates atherosclerosis in ApoE $^{-/-}$ mice

A: Gross oil red O staining of aortas from C57BL/6J or ApoE $^{-/-}$ mice fed with WD or HFD for 9 weeks; B: Serum total cholesterol(TC), total triglycerides(TG), low-density lipoprotein cholesterol(LDL-C) and high-density lipoprotein cholesterol(HDL-C) level ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$); C: Representative images of oil red O, H&E, Masson staining of aortic root sections ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$). ATO: Atorvastatin

[#] $P < 0.05$, ^{##} $P < 0.01$ vs control group; ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$ vs model group

比, GBE-L 组和 GBE-H 组的小鼠 TC、TG、LDL-C 水平显著下降, HDL-C 水平显著上升 (图 1-B)。进一步的油红 O、H&E 和 Masson 染色结果显示, 与对照组相比, 模型组内脂质蓄积面积明显增加, 坏死核心的数量和面积亦显著上升。给予 GBE 治疗后, 小鼠主动脉根部坏死核心的面积和脂质沉积水平均显著降低 (图 1-C)。这些结果说明, GBE 能减少 ApoE^{-/-} 小鼠主动脉脂质蓄积, 有效延缓 AS 病

变的发展。

3.2 GBE 可以缓解 ApoE^{-/-} 小鼠血清炎症水平

炎症的产生是诱发 AS 的另一个重要的独立风险因素^[14], 因此使用 ELISA 试剂盒检测了 ApoE^{-/-} 小鼠血清炎症水平。结果发现, 与模型组相比, GBE-L 组和 GBE-H 组小鼠血清炎症因子 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α (图 2)。这些结果说明, GBE 可以减缓 ApoE^{-/-} 小鼠血清炎症。

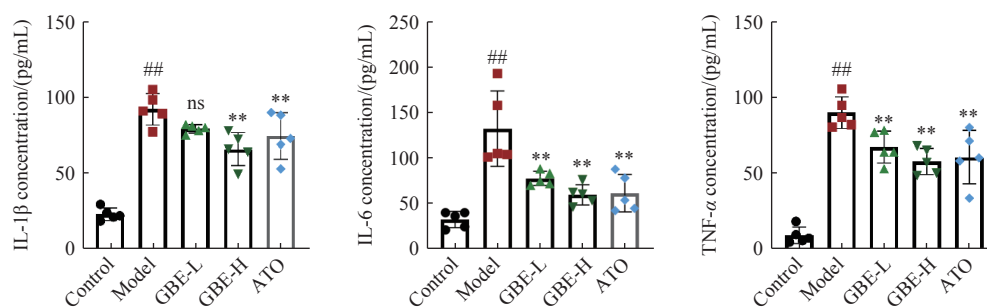


Figure 2 Effect of GBE on the expression level of serum inflammation (IL-1 β , IL-6, TNF- α) in ApoE^{-/-} mice ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

[#] $P < 0.05$, ^{##} $P < 0.01$ vs control group; ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$ vs model group

3.3 网络药理学筛选 GBE 抑制 AS 的关键靶点

为探究 GBE 改善 AS 的可能靶点, 使用 TCMSP 数据库以 OB $\geq$ 30% DL $\geq$ 0.18 的条件, 对 GBE 成分进行筛选, 共筛选到 27 个有效成分 (图 3-A)。使用 Swiss Target Prediction 数据库对 27 个成分的靶点进行预测选取 probability $\geq$ 0.1 并去重后得到 621 个化合物可能的靶点。使用 GeneCards 数据库 (score $\geq$ 中位数 1.44)、OMIM 数据库 (选择 approved symbol) 和 DisGeNET 数据库 (score $\geq$ 中位数 0.02) 对 AS 靶点进行筛选, 得到疾病靶点 1660 个。使用 Venny 图将共同靶点取交集后共得到 276 个疾病-化合物共有靶点 (图 3-B)。使用 Cytoscape 3.9.0 对共有靶点进行分析, 以寻找核心靶点。结果显示, Betweenness 值为 243, Closeness unDir 值为 0.001963963, Degree unDir 值为 50.38686131, 找到核心靶点 55 个、1198 个连接。其中 IL-6、TNF、ALB、AKT1、IL-1 β 、PPAR γ 是银杏叶提取物抑制 AS 的关键靶点 (图 3-C)。

3.4 GO 功能和 KEGG 通路富集分析

为探究 GBE 治疗 AS 可能机制, 使用 DAVID 数据库对 3.3 中获得的 276 个药物与疾病共有靶点进行 GO 功能富集分析。结果显示, 276 个靶点共获得 1842 个条目, 其中 BP 条目 1143 个, CC 条目 112 个, MF 条目 226 个。生物过程集中于胆固醇

稳态、炎症反应和胆固醇代谢相关中; 细胞成分集中于细胞外空间、胞外域和等离子膜中; 分子功能主要集中于: 酶结合、RNA 转录因子活性和蛋白质结合中 (图 4-A)。同时, 将 276 个药物与疾病共有靶点进行 KEGG 分析。结果显示, KEGG 共富集 180 个条目, 去 P 值排名前 20 绘制气泡图 (图 4-B), 主要通路有脂质与 AS、剪切应力与 AS、PPAR 通路和胆固醇代谢等。富集分析结果表明, GBE 可能可以通过维持胆固醇稳态和缓解炎症改善 AS, 机制可能与 PPAR 通路有关。

3.5 GBE 可以缓解泡沫细胞生成

泡沫细胞的形成 AS 进展的重要标志, 抑制泡沫细胞的形成是缓解 AS 的有效策略。GO 和 KEGG 富集分析发现, GBE 与胆固醇稳态息息相关, 而泡沫细胞的生成是胆固醇摄取过度而外排不足引起胆固醇稳态被破坏导致的。首先向 THP-1 细胞中加入 100 ng/mL PMA, 诱导分化 24 h 形成巨噬细胞后, 使用不同浓度的 GBE 刺激 THP-1 源巨噬细胞, 结果发现 150 μ g/mL 以下浓度对细胞活力并未见显著影响 (图 5-A), 后胞实验使用 20 和 60 μ g/mL 作为细胞给药的低、高剂量。对 THP-1 源巨噬细胞进行油红 O 染色结果表明, GBE 处理泡沫细胞 24 h 后可以显著降低胞内脂质蓄积, 抑制

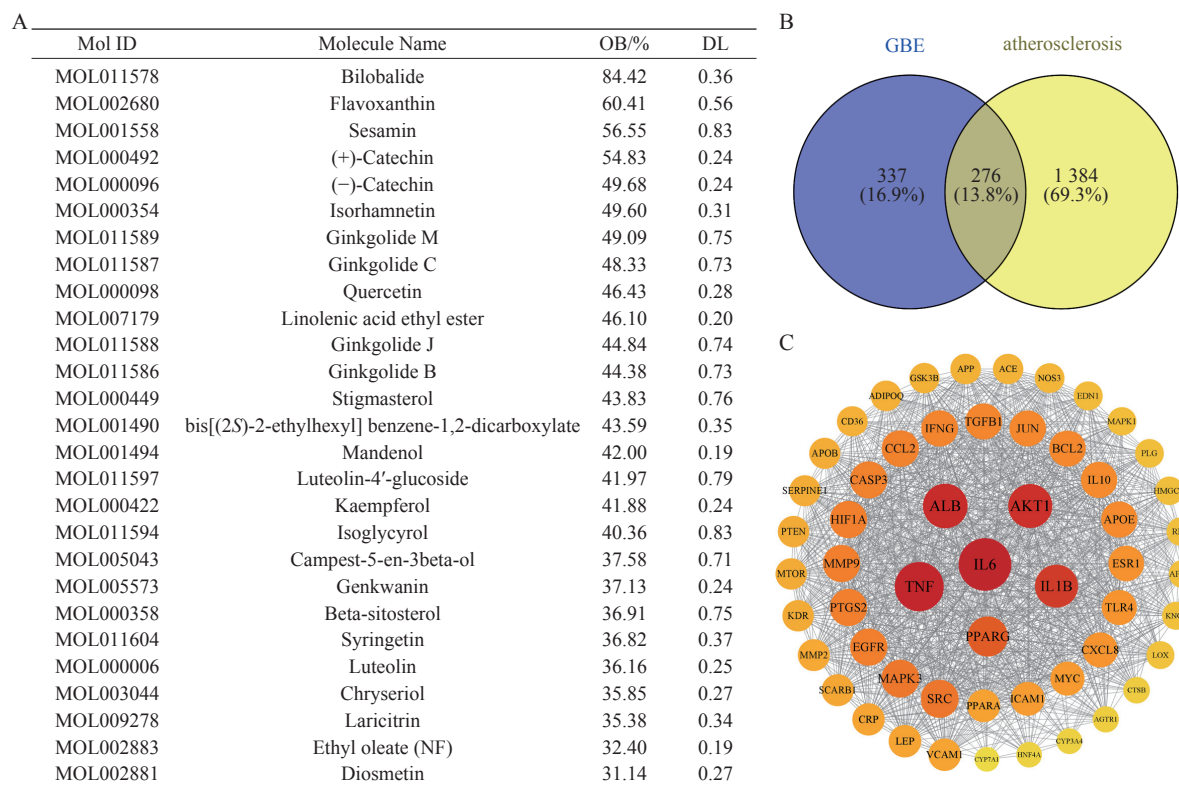


Figure 3 Pharmacological screening of GBE-AS network

A: List of active ingredients for pharmacological screening of GBE-AS networks; B: Venny figure; C: PPI protein interaction

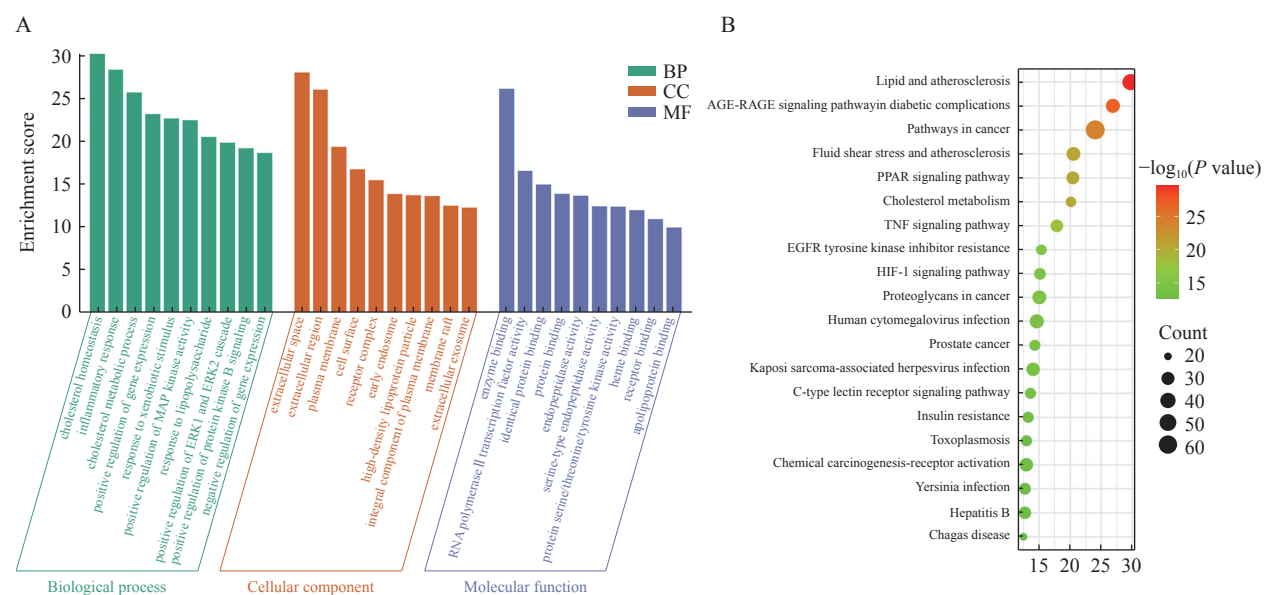


Figure 4 Pharmacological analysis of the GBE-AS network

A: GO enrichment analysis; B: KEGG enrichment analysis

oxLDL 诱导的泡沫细胞的生成。这一结果与胞内胆固醇酯、甘油三酯水平检测结果相一致 (图 5-B, 图 5-C)。为了进一步确认 GBE 对泡沫细胞生成的影响, 使用 Dil (1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethy-

lindocarbocyanine perchlorate) 荧光标记的 oxLDL 与药物共同孵育 6 h。结果显示, Dil-oxLDL 孵育后 Model 组荧光强度较高, 表明有大量泡沫细胞生成, 与模型组相比, GBE 可以显著降低细胞的荧光

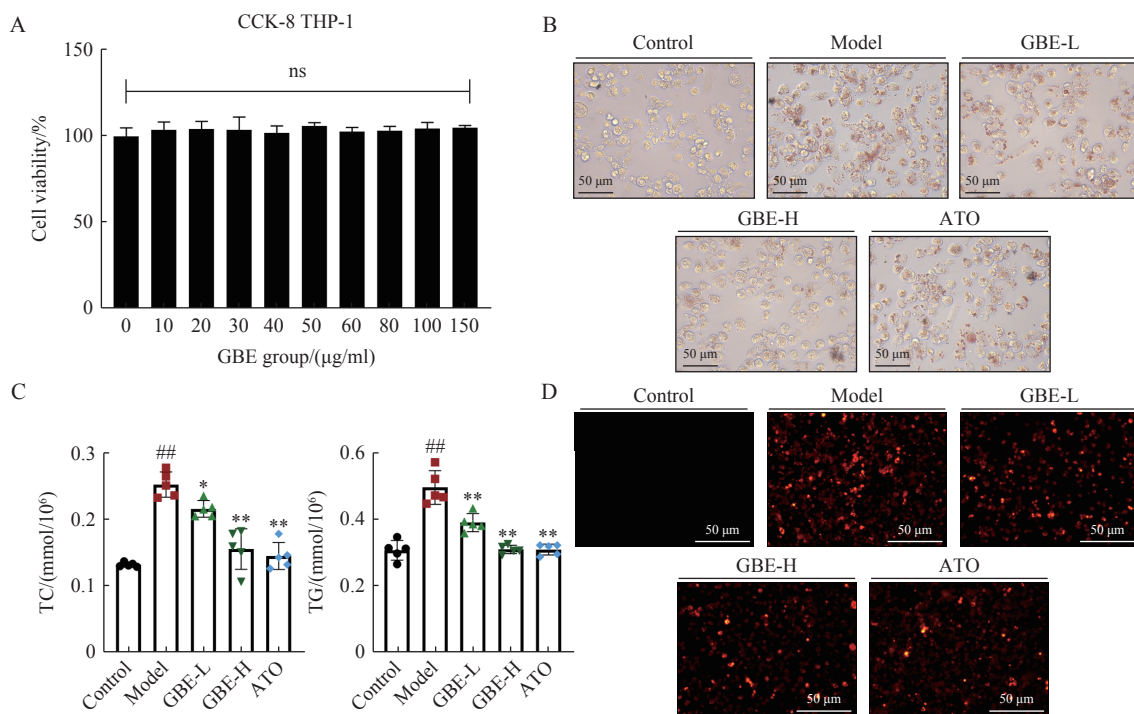


Figure 5 GBE attenuates lipid accumulation and the formation of foam cells in THP-1

A: Viability of THP-1 after treating with different concentrations of GBE was detected by the CCK-8 assay; B: THP-1 cells were stained with oil red O after exposing with oxLDL after treating by GBE (20 and 60 µg/mL) or ATO (1 µmol/L) for 24 h ($\bar{x} \pm s, n = 3$); C: Comparison of THP-1 cells TC and TG ($\bar{x} \pm s, n = 5$); D: Fluorescent images for macrophage lipid uptake in THP-1. THP-1 was stained with Dil-oxLDL (30 µg/mL) after treating by GBE (20 and 60 µg/mL) or ATO (1 µmol/L) for 6 h, respectively ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

[#] $P < 0.05$, ^{##} $P < 0.01$ vs control group; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs model group

强度,减少泡沫细胞的生成(图 5-D)。以上结果说明,GBE可以减少泡沫细胞的生成,缓解胞内脂质蓄积。

3.6 GBE可以通过升高PPAR γ 增加胆固醇外排

在泡沫细胞形成过程中,胆固醇摄取和排出的不平衡是泡沫细胞内脂质蓄积的主要原因。因此,通过RT-qPCR检测了THP-1细胞胆固醇摄取和外排的受体膜蛋白的表达。结果表明GBE可以显著减少SR-A1 mRNA水平,升高ABCA1、ABCG1的mRNA水平,而对CD36的mRNA水平没有显著影响(图 6-A)。

KEGG富集分析发现,GBE的可能作用机制与PPAR通路相关,而Cytoscape筛选的核心靶点中,PPAR γ 是排名较前的核心靶点,同时PPAR γ 的上调被认为可以显著增强胆固醇外排,减少泡沫细胞的生成^[15]。因此检测了GBE对PPAR γ 影响。结果显示,GBE可以显著升高PPAR γ 的mRNA和蛋白水平(图 6-B和图 6-C),同时免疫荧光发现,GBE可以显著增强PPAR γ 的表达(图 6-D)。

以上结果说明,GBE可能可以通过增强PPAR γ 加速胆固醇外排抑制泡沫细胞的生成。

4 讨论

泡沫细胞的形成是AS的特征性病理标志,抑制泡沫细胞形成可有效缓解AS^[16]。本研究结果表明,GBE可降低ApoE^{-/-}小鼠体内血脂水平和血清炎症因子分泌,减少动脉斑块形成;机制探究发现,GBE可以通过增强PPAR γ 的表达,促进ABCA1/ABCG1的表达,增加胆固醇流出,减少泡沫细胞的生成。

血脂异常是AS的重要危险因素,血脂通常包括TC、TG、LDL-C和HDL-C。LDL-C是与AS发病机制最相关的一种脂蛋白,在内皮损伤部位,LDL-C进入内皮下空间形成oxLDL是驱动AS发生发展的关键。临床研究发现,血浆LDL-C浓度与ASCVD事件发生风险呈对数线性正相关,将LDL-C水平控制在1.8 mmol/L以下,AS斑块进展可以得到实质性减缓,LDL-C水平控制在1.4 mmol/L以下,心血管死亡风险降低22%^[17-18]。另一种脂蛋

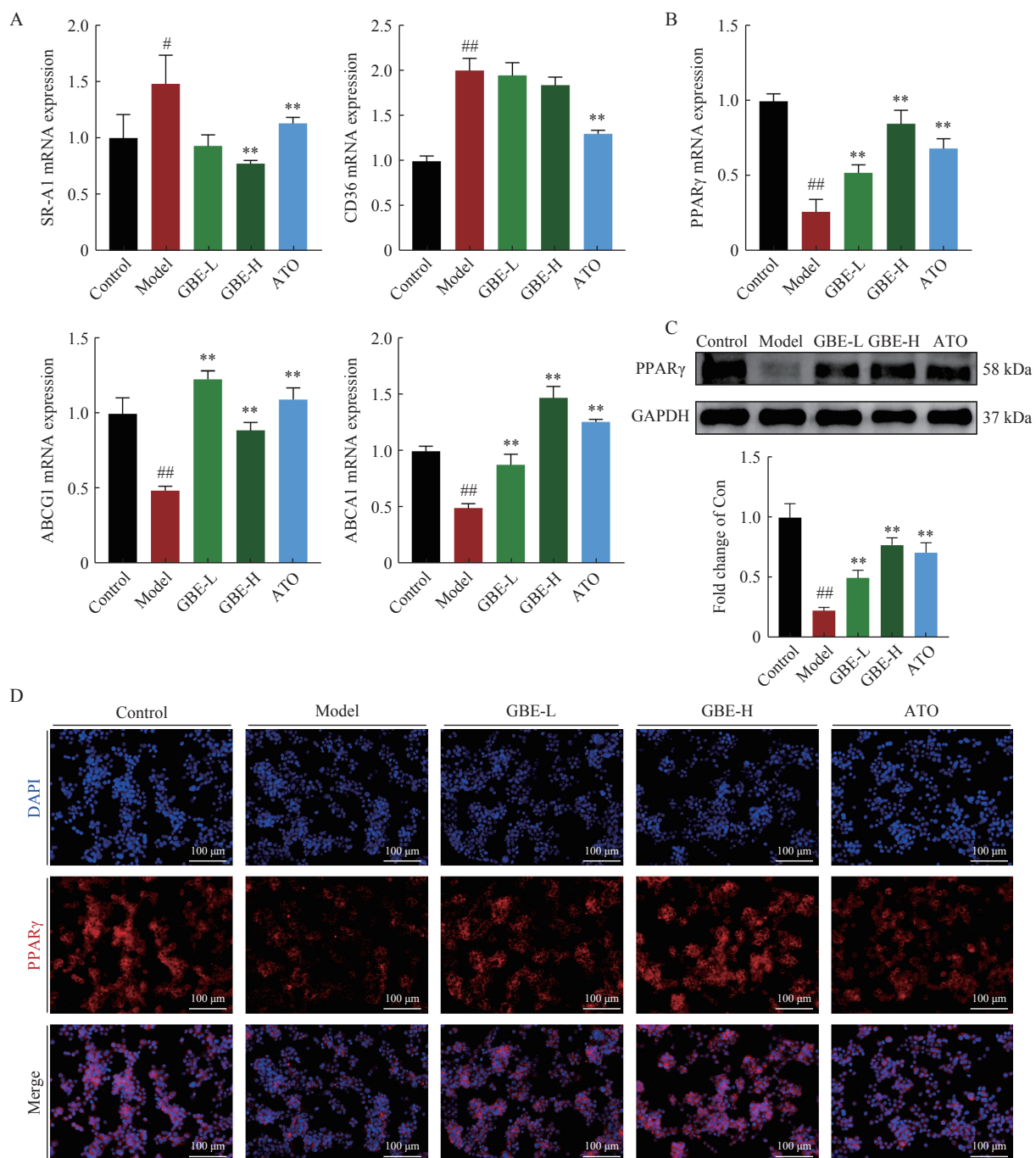


Figure 6 GBE improves cholesterol uptake and efflux in foam cells by enhancing PPAR γ expression ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

A: Relative mRNA expression of macrophage cholesterol uptake (CD36, SRA1) and efflux (ABCA1, ABCG1) in THP-1; B-C: Relative mRNA and protein expression of PPAR γ in THP-1; D: Relative protein expression of PPAR γ by immunofluorescent in THP-1

SR-A1: Macrophage scavenger receptor class A1; CD36: Cluster of differentiation 36; ABCA1: ATP-binding cassette transporter A1; ABCG1: ATP binding cassette subfamily G member 1; PPAR γ : Peroxisome proliferator activated receptor gamma

[#] $P < 0.05$, ^{##} $P < 0.01$ vs control group; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs model group

白 HDL-C 可以将过多的胆固醇运输到肝脏并降解, 减轻血管的脂质蓄积, 起到血管保护作用, 临床研究表明 HDL-C 浓度与心血管疾病风险呈负相关^[19]。本实验研究发现, GBE 可以改善血脂水平,

特别是降低 LDL-C 水平, 升高 HDL-C 水平。

目前, 由于 AS 的发病机制复杂, 预防或治疗 AS 的治疗药物仍然有限。近年来, 研究人员发现, 增加胆固醇外排是一个具有良好潜力的治疗方向^[4]。

ABCG1 和 ABCA1 是 AS 斑块中胆固醇外排和 RCT 的关键受体。体外实验发现, ABCG1 和 ABCG1 介导的胆固醇外排占巨噬细胞来源的泡沫细胞总胆固醇外排的 70%^[6]。ABCA1 促进胆固醇外排至载脂蛋白 ApoA-I, 而 ABCG1 促进胆固醇外排至 HDL。研究发现, ABCA1 在人体中发生基因突变引起功能丧失会导致早期严重 AS 即丹吉尔病, 患者表现为 HDL 水平极低且多脏器中有大量脂质斑块生成^[20]。同时, 巨噬细胞中 ABCG1 和 ABCA1 的特异性缺失可加速 ApoE^{-/-}小鼠 AS 进程, 缺乏 ABCG1 和 ABCA1 的 ApoE^{-/-}小鼠在心肌、肝、肺、胸腺、脾等多个组织中积累了炎性泡沫细胞^[21]。本实验研究结果表明, GBE 可以显著上调 ABCA1、ABCG1 的表达, 增加胆固醇外排。

过氧化物酶体增殖物激活受体 (peroxisome proliferators-activated receptors, PPARs) 家族是核受体超家族的一员, 脂质异常中发挥着重要的作用。许多研究表明在泡沫细胞中, PPAR γ 的激活可以上调肝 X 受体 α 进而增加 ABCA1 的表达。同时, 在泡沫细胞中敲除 PPAR γ 会同时引起 ABCA1、ABCG1 的表达降低, 减少胆固醇外排^[22]。PPAR γ 被认为是一种营养敏感信号传感器, 敲除 PPAR γ 会引起脂肪酸、脂代谢紊乱和胰岛素抵抗, 进一步加速 AS 的进展^[15]。通过 KEGG 对 GBE 可能的作用通路进行富集, PPARs 通路是富集程度较高的通路信号之一, 令人欣喜的是, GO 功能富集显示, GBE 在胆固醇稳态、脂代谢和胆固醇外流中发挥着重要的作用。本实验结果也说明, GBE 在可以通过上调 PPAR γ 增加胆固醇外流, 减少泡沫细胞的生成。

炎症作为另一个独立危险因素, 其重要性逐渐受到人们的广泛关注^[23]。前人研究发现, 在给予 PCSK9 单抗控制血脂后, 心血管事件在 2 年内复发概率高达 9.3%。在传统降脂类药物治疗后这种持续的心血管风险被称为“剩余风险”。临床研究已经表明这种增加的风险主要是由于炎症^[24]。在临床试验中, IL-1 β 抑制剂卡纳单抗^[25]和低剂量秋水仙碱^[26]通过抑制促炎信号的传导, 在不降低血脂水平的情况下, 可以显著降低主要不良心血管事件和紧急血运重建概率^[27]。然而, 目前抗炎类药物仍存在着诸多不足, 例如, 秋水仙碱会引起较为普遍的胃肠道反应, 长期服用会引起肌肉、周围神经病变等不良反应^[28]。而卡纳单抗抑制 IL-1 β 表达的同时

会损害机体免疫反应, 产生免疫抑制作用, 与安慰剂组相比, 卡纳单抗治疗组致死性感染相关事件发生率有所增高^[29]。因此, 寻找新的抗炎药物缓解血管炎症是未来治疗 AS 的重要方向。GBE 是银杏叶经过乙醇提取干燥后得到的提取物, 2020 版本《中华人民共和国药典》规定其有效黄酮苷类成分应 $\geq 24\%$ 、萜类内酯成分应 $\geq 6\%$, 总银杏酸小于 0.0005%, 临床广泛用于治疗急慢性脑机能不全和眼、耳部血流或神经障碍^[30]。体内毒理学实验发现, 在大鼠体内给药 4000 mg/kg GBE 30 d 未见明显毒副作用, GBE 的 LD₅₀ 高达 13429 mg/kg, 具有高效低毒的特性^[12]。同时, 在多种疾病中 GBE 展现出良好的抗炎活性, 例如, GBE 可以通过抑制心肌细胞 NF- κ B 通路, 减少 IL-1 β 、TNF- α 等炎症因子的分泌, 缓解心肌缺血再灌注的损伤^[31]。在 AS 中, GBE 可以通过减少 VCAM-1、ICAM-1 的分泌, 减少主动脉的血管炎症^[32-33]。本实验研究结果表明, 给药 GBE 可以显著缓解 AS 小鼠的血管炎症。因此, 将 GBE 作为新的抗炎类药物开发, 具有良好的治疗潜力。

综上, GBE 可以显著改善 ApoE^{-/-}小鼠的 AS, 这一作用可能是通过上调 PPAR γ 增加 ABCA1/ABCG1 介导的胆固醇外排导致的, 为 GBE 的临床适应证的拓展提供理论依据。

References

- [1] Libby P. The changing landscape of atherosclerosis[J]. *Nature*, 2021, **592**(7855): 524-533.
- [2] Libby P, Buring JE, Badimon L, et al. Atherosclerosis[J]. *Nat Rev Dis Primers*, 2019, **5**(1): 56.
- [3] Fan JL, Watanabe T. Atherosclerosis: known and unknown[J]. *Pathol Int*, 2022, **72**(3): 151-160.
- [4] Ouimet M, Barrett TJ, Fisher EA. HDL and reverse cholesterol transport[J]. *Circ Res*, 2019, **124**(10): 1505-1518.
- [5] Liu XF, Wu JS, Tian RM, et al. Targeting foam cell formation and macrophage polarization in atherosclerosis: the therapeutic potential of rhubarb[J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, **129**: 110433.
- [6] Wang DD, Yang Y, Lei YN, et al. Targeting foam cell formation in atherosclerosis: therapeutic potential of natural products[J]. *Pharmacol Rev*, 2019, **71**(4): 596-670.
- [7] Yvan-Charvet L, Matsuura F, Wang N, et al. Inhibition of cholesteryl ester transfer protein by torcetrapib modestly increases macrophage cholesterol efflux to HDL[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2007, **27**(5): 1132-1138.
- [8] Adorni MP, Zimetti F, Billheimer JT, et al. The roles of different pathways in the release of cholesterol from macrophages[J].

- J Lipid Res*, 2007, **48**(11): 2453-2462.
- [9] Chiu YL, Tsai WC, Wu CH, *et al.* *Ginkgo biloba* induces thrombomodulin expression and tissue-type plasminogen activator secretion via the activation of Krüppel-like factor 2 within endothelial cells[J]. *Am J Chin Med*, 2020, **48**(2): 357-372.
- [10] Wang Y, Xu YY, Xu XW, *et al.* *Ginkgo biloba* extract ameliorates atherosclerosis via rebalancing gut flora and microbial metabolism[J]. *Phytother Res*, 2022, **36**(6): 2463-2480.
- [11] Liu HJ, Wang XL, Zhang L, *et al.* Inhibitions of vascular endothelial growth factor expression and foam cell formation by EGb 761, a special extract of *Ginkgo biloba*, in oxidatively modified low-density lipoprotein-induced human THP-1 monocytes cells[J]. *Phytomedicine*, 2009, **16**(2/3): 138-145.
- [12] Li TH. *Ginkgo biloba* extract (EGb761) inhibiting smoothmuscle foam cell formation and the underlying mechanisms (银杏叶提取物 EGb761 抑制平滑肌细胞泡沫化的机制研究)[D]. Xi'an: Air Force Medical University, 2019.
- [13] Tall AR, Thomas DG, Gonzalez-Cabodevilla AG, *et al.* Addressing dyslipidemic risk beyond LDL-cholesterol[J]. *J Clin Invest*, 2022, **132**(1): e148559.
- [14] Bäck M, Yurdagül A Jr, Tabas I, *et al.* Inflammation and its resolution in atherosclerosis: mediators and therapeutic opportunities[J]. *Nat Rev Cardiol*, 2019, **16**(7): 389-406.
- [15] Miao M, Wang X, Liu T, *et al.* Targeting PPARs for therapy of atherosclerosis: a review[J]. *Int J Biol Macromol*, 2023, **242**(Pt 2): 125008.
- [16] Singh S, Changkija S, Mudgal R, *et al.* Bioactive components to inhibit foam cell formation in atherosclerosis[J]. *Mol Biol Rep*, 2022, **49**(3): 2487-2501.
- [17] Ference BA, Graham I, Tokgozoglu L, *et al.* Impact of lipids on cardiovascular health: JACC health promotion series[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2018, **72**(10): 1141-1156.
- [18] Ference BA, Ginsberg HN, Graham I, *et al.* Low-density lipoproteins cause atherosclerotic cardiovascular disease. 1. Evidence from genetic, epidemiologic, and clinical studies. A consensus statement from the European Atherosclerosis Society Consensus Panel[J]. *Eur Heart J*, 2017, **38**(32): 2459-2472.
- [19] Raja V, Aguiar C, Alsayed N, *et al.* Non-HDL-cholesterol in dyslipidemia: review of the state-of-the-art literature and outlook[J]. *Atherosclerosis*, 2023, **383**: 117312.
- [20] Tang HY, Xing CH, Zhang MM. Research progress on role of ABCA1 in regulation of cell death in atherosclerosis[J]. *Lab Med Clin* (检验医学与临床), 2023, **20**(13): 1945-1949.
- [21] Westerterp M, Bochem AE, Yvan-Charvet L, *et al.* ATP-binding cassette transporters, atherosclerosis, and inflammation[J]. *Circ Res*, 2014, **114**(1): 157-170.
- [22] Xu PF, Zhai YG, Wang J. The role of PPAR and its cross-talk with CAR and LXR in obesity and atherosclerosis[J]. *Int J Mol Sci*, 2018, **19**(4): 1260.
- [23] Doran AC. Inflammation resolution: implications for atherosclerosis[J]. *Circ Res*, 2022, **130**(1): 130-148.
- [24] Pradhan AD, Aday AW, Rose LM, *et al.* Residual inflammatory risk on treatment with PCSK9 inhibition and statin therapy[J]. *Circulation*, 2018, **138**(2): 141-149.
- [25] Everett BM, MacFadyen JG, Thuren T, *et al.* Inhibition of interleukin-1 β and reduction in atherothrombotic cardiovascular events in the CANTOS trial[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2020, **76**(14): 1660-1670.
- [26] Tardif JC, Kouz S, Waters DD, *et al.* Efficacy and safety of low-dose colchicine after myocardial infarction[J]. *N Engl J Med*, 2019, **381**(26): 2497-2505.
- [27] Nidorf SM, Fiolet ATL, Mosterd A, *et al.* Colchicine in patients with chronic coronary disease[J]. *N Engl J Med*, 2020, **383**(19): 1838-1847.
- [28] Ibañez B, Fuster V. CANTOS: a gigantic proof-of-concept trial[J]. *Circ Res*, 2017, **121**(12): 1320-1322.
- [29] Schenone AL, Menon V. Colchicine in pericardial disease: from the underlying biology and clinical benefits to the drug-drug interactions in cardiovascular medicine[J]. *Curr Cardiol Rep*, 2018, **20**(8): 62.
- [30] Singh SK, Srivastav S, Castellani RJ, *et al.* Neuroprotective and antioxidant effect of *Ginkgo biloba* extract against AD and other neurological disorders[J]. *Neurotherapeutics*, 2019, **16**(3): 666-674.
- [31] Sun J. A comprehensive study on the effects of *Ginkgo biloba* extract on the mechanism of atherosclerosis(银杏叶提取物对动脉粥样硬化相关机制影响的综合研究)[D]. Dalian: Dalian Medical University, 2015.
- [32] Ou HC, Hsieh YL, Yang NC, *et al.* *Ginkgo biloba* extract attenuates oxLDL-induced endothelial dysfunction via an AMPK-dependent mechanism[J]. *J Appl Physiol* (1985), 2013, **114**(2): 274-285.
- [33] Jiao YB, Rui YC, Li TJ, *et al.* Expression of pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines in brain of atherosclerotic rats and effects of *Ginkgo biloba* extract[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2005, **26**(7): 835-839.