

# 基于网络药理学研究 6-姜辣素改善 L6 成肌细胞糖脂代谢紊乱的作用机制

曾 颜<sup>1</sup>, 田珈瑜<sup>2</sup>, 詹权操<sup>2</sup>, 刘宇哲<sup>1</sup>, 李 冬<sup>2</sup>, 王 尚<sup>2\*</sup>, 王建伟<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>重庆医科大学基础医学院; <sup>2</sup>重庆医科大学中医药学院 中医药防治代谢性疾病重庆市重点实验室, 重庆 400016

**摘 要:**运用网络药理学研究 6-姜辣素改善糖脂代谢紊乱的作用机制, 并通过高果糖高油酸培养的 L6 大鼠成肌细胞模型进行验证。借助 TC MSP 数据库、SwissTargetPrediction 数据库、GeneCards 数据库, 对 6-姜辣素作用糖脂代谢紊乱的靶点进行预测, 运用软件 Cytoscape 3.7.1 构建化合物靶点-疾病网络关系, 采用 STRING 数据库进行蛋白质-蛋白质相互作用 (protein-protein interaction, PPI) 分析, 利用 R 包进行 GO 功能富集和 KEGG 通路富集分析; 运用 KEGG Mapper 对富集基因进行基因映射。结合 GO 富集分析、KEGG 通路分析和基因映射结果, 该研究选择 PI3K-AKT 信号通路、mTOR、NF- $\kappa$ B-p65、ERK 分子进一步进行体外实验验证。通过高果糖高油酸构建 L6 大鼠成肌细胞糖脂代谢紊乱模型, 对细胞进行甘油三酯 (TG) 测定和油红染色, 蛋白免疫印迹法 (Western blot) 检测炎症相关蛋白 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  的表达, 实时荧光定量聚合酶链式反应 (real time polymerase chain reaction, RT-PCR) 和蛋白免疫印迹法检测 6-姜辣素对 PI3K-AKT 信号通路、mTOR、NF- $\kappa$ B-p65、ERK 分子的基因、蛋白表达的影响。网络药理学分析共得到 6-姜辣素治疗糖脂代谢紊乱靶点 113 个, GO 富集分析发现与蛋白质激酶活性关系密切, KEGG 富集共筛选出 20 条相关信号通路, 包括 PI3K-AKT 信号通路、乙型肝炎、丙型肝炎、人类巨细胞病毒感染、自噬等。体外实验表明 6-姜辣素能减少高果糖高油酸诱导的 L6 细胞脂质积累, 减少炎症相关蛋白 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  的表达, 上调 AKT 的基因和蛋白磷酸化水平, 下调 mTOR、NF- $\kappa$ B-p65、ERK 的磷酸化水平。这些结果提示 6-姜辣素能够改善高果糖高油酸诱导的 L6 大鼠成肌细胞糖脂代谢紊乱, 其机制可能与激活 PI3K-AKT-mTOR 轴改善胰岛素敏感性和抑制 NF- $\kappa$ B-p65、ERK 的磷酸化降低炎症反应有关, 这为后续的基础研究提供理论基础。

**关键词:** 6-姜辣素; 糖脂代谢紊乱; 网络药理学; L6 大鼠成肌细胞

中图分类号: R285

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2022)6-1057-10

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2022.6.019

## Mechanism of 6-gingerol alleviating glycolipid metabolism disorder in L6 cells based on network pharmacology

ZENG Yan<sup>1</sup>, TIAN Jia-yu<sup>2</sup>, ZHAN Quan-cao<sup>2</sup>, LIU Yu-zhe<sup>1</sup>, LI Dong<sup>2</sup>, WANG Shang<sup>2\*</sup>, WANG Jian-wei<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Faculty of Basic Medical Sciences, Chongqing Medical University;

<sup>2</sup>Chongqing Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine for the Prevention and Treatment of Metabolic Diseases, College of Traditional Chinese Medicine, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China

**Abstract:** The mechanism of 6-gingerol in improving glycolipid metabolism disorders was investigated by network pharmacology and confirmed by L6 cells cultured with high fructose and high oleic acid. Using TC MSP database, SwissTargetPrediction database and GeneCards database, the targets of 6-gingerol on glycolipid metabolism disorder were obtained, Cytoscape 3.7.1 was used to construct the relationship between compound target and disease network, protein-protein interaction (PPI) was analyzed using STRING database, GO functional enrichment and KEGG pathway enrichment through R packet, and gene mapping was carried out by KEGG Mapper. Combined with GO enrichment analysis, KEGG pathway analysis and gene mapping results, this study selected the PI3K-AKT-mTOR axis, NF- $\kappa$ B-p65 and ERK *in vitro*. The model of glycolipid metabolism dis-

收稿日期: 2021-11-16 接受日期: 2022-01-24

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (81973653, 81673659, 81374033)

\* 通信作者 Tel: 86-018602326815; E-mail: wjwcq68@163.com, wangshang0227@sina.com

order in L6 cells were established by high fructose and high oleic acid. TG and oil red staining were used to assess lipid deposition level and Western blot was used to detect the expression of inflammatory factors IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$ . RT-PCR and western blot were used to detect the levels of mRNA and protein associated with PI3K-AKT-mTOR, NF- $\kappa$ B-p65 and ERK. A total of 113 targets for 6-gingerol treatment of glucolipid metabolism disorders were identified by network pharmacologic analysis. GO enrichment analysis showed that 6-gingerol was closely related to protein kinase activity. A total of 20 KEGG signaling pathways were screened including PI3K-AKT signaling pathway, hepatitis B, hepatitis C, human cytomegalovirus infection, autophagy, etc. *In vitro* experiments showed that 6-gingerol could reduce lipid accumulation in L6 cells induced by high fructose and high oleic acid and the expression of pro-inflammatory factors IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$ . Meanwhile, 6-gingerol could up-regulate the expression of phosphorylation of AKT, and down-regulate the expression of phosphorylation of mTOR, NF- $\kappa$ B-p65 and ERK. In addition, 6-gingerol could increase the expression of AKT at mRNA level. These results suggest that 6-gingerol can improve glucolipid metabolism disorder in L6 cells treated with high fructose and high oleic acid, and relate to activate PI3K-AKT-mTOR axis and inhibit inflammation through blocking phosphorylation of NF- $\kappa$ B-p65 and ERK. These findings provide theoretical basis for subsequent basic research.

**Key words:** 6-gingerol; glycolipid metabolism disorder; network pharmacology; L6 cells

糖脂代谢紊乱作为代谢性疾病的重要特征, 严重危害人类健康。随着高脂肪或高糖饮食的迅速增加, 肥胖、糖尿病、高血压、血脂异常、非酒精性脂肪肝<sup>[1]</sup>、动脉粥样硬化等与糖脂代谢相关的疾病引起了越来越多的关注。胰岛素抵抗 (insulin resistance, IR) 是糖脂代谢的主要核心病理之一, 普遍存在于糖脂代谢异常患者中。骨骼肌是机体能量代谢的重要场所, 是机体消耗葡萄糖的主要器官, 胰岛素刺激所致的葡萄糖摄取与脂肪酸的消耗约 80% 是由骨骼肌完成的, 因此骨骼肌组织在胰岛素抵抗中占有重要地位, 是调节糖脂代谢的关键外周组织<sup>[2]</sup>。研究显示<sup>[3]</sup>, 肌肉线粒体供能障碍、脂肪酸摄入增加及氧化减少, 与脂质沉积、IR、2 型糖尿病 (T2DM) 等糖脂代谢紊乱相关疾病关系密切。以游离脂肪酸刺激 L6 大鼠成肌细胞建立糖脂代谢紊乱模型已经应用于多种降糖降脂潜在药物的评价工作中<sup>[4,5]</sup>。然而, 由于糖脂代谢调控机制复杂, 药物治疗作用靶点单一且存在不良反应风险, 因此, 寻找安全、有效且全面改善糖脂代谢紊乱的药物是临床医师一直致力解决的难题。传统中医药在防治糖脂代谢紊乱方面具有明显的特色和优势, 具有多靶点、多通路、联合增效、协同交互等特点。

中医学认为, 糖脂代谢紊乱相关疾病属于消渴、脾瘅、痰浊、瘀血、症瘕、积聚范畴, 是一组以脏腑功能失调, 津液失于输化导致的综合症。血脂血糖犹如营血津液, 为水谷化生的精微物质, 生理情况下, 脏腑功能健全, 水谷精微贯注血脉, 温煦肌肤, 濡养脏腑百骸。过食肥甘醇酒厚味、久坐久卧损伤脾气, 脾不散精, 精气不能上归于肺而朝百脉, 水谷精华留

滞不化, 土塞木郁, 郁而化热, 耗气伤津, 清气不升, 浊阴不降, 聚湿生痰, 留而成瘀, 痰浊、瘀因阻遏经络脏腑导致血糖血脂升高, 这是糖脂代谢紊乱相关疾病的基本病因病机。生姜为姜科植物姜 (*Zingiber officinale* Rosc) 的根茎。姜为世界上最常用的调味料之一, 也是世界传统医学中最常用的草药之一。中医认为, 生姜味辛能散, 归脾、胃、肺经, 能温中散寒, 燥湿消痰, 在调理脾胃, 治疗痰湿的方药中被广泛应用。生姜能够改善脂质代谢, 具有较好的降血脂作用, 生姜中的 6-姜辣素在降血脂方面有较高的生物活性。本课题组前期研究表明, 6-姜辣素能明显改善高果糖所致以及衰老相关大鼠脂肪肝、脂质异位沉积、线粒体功能、高甘油三酯血症及胰岛素敏感性<sup>[6]</sup>。Pournaderi 等<sup>[7]</sup>发现 6-姜辣素作为生姜主要的活性成分, 在抗炎抗氧化方面有着显著的效果。Algandaby 等<sup>[8]</sup>指出 6-姜辣素的抗炎作用可以防治大鼠的肝纤维化。Saravanan 等<sup>[9]</sup>研究指出 6-姜辣素通过调控脂质分布, 调节胰岛素、瘦素、淀粉酶和脂肪酶的含量从而减轻高脂饮食诱导的肥胖。

虽然已有大量文献报道指出 6-姜辣素可改善糖脂代谢紊乱, 但其具体作用的靶点和机制尚不明确。随着生物信息学的发展, 基于网络药理学探究药物作用靶点已成为新兴的研究热点, 本研究通过网络药理学与体外实验相结合的方法, 以高果糖高油酸诱导的 L6 大鼠成肌细胞为研究对象, 探讨 6-姜辣素治疗糖脂代谢紊乱的作用靶点和机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 6-姜辣素相关靶点筛选

运用 TCMPSP<sup>[10]</sup> 数据库和 SwissTargetPredic-

tion<sup>[11]</sup>数据库筛选 6-姜辣素作用靶点,6-姜辣素的 SMILES 格式在 PubChem<sup>[12]</sup>数据库获取,并查找已发表文献对未筛选出的靶点进行补充。合并 2 个数据库靶点后,删除重复数据,利用 Uniprot<sup>[13]</sup>蛋白标准化数据库对 6-姜辣素相关靶点进行统一转化。

## 1.2 糖脂代谢紊乱相关靶点筛选

以“glycolipid metabolism disorder”为关键词,通过 GeneCards<sup>[14]</sup>数据库筛选目标靶点,以 GeneCards 数据库 relevance score > 0.1 选取目标靶点,查找已发表文献对未筛选出的靶点进行补充。

## 1.3 6-姜辣素-糖脂代谢紊乱靶点的蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)网络构建

为明确 6-姜辣素药物靶点与糖脂代谢紊乱靶点的相互关系,通过 Cytoscape 3.7.1 软件分析得到关键蛋白基因,以度(degree) > 平均值(约 5.84)将所得交集靶点导入 STRING 数据库,构建蛋白 PPI 网络图。

## 1.4 6-姜辣素-糖脂代谢紊乱靶点富集分析

利用 R 包对靶点分子进行基因本体(GO)、京都基因与基因组百科全书(KEGG)富集,得到核心靶点的分子功能(molecular functions, MF)、生物过程(biological processes, BP)、细胞组分(cellular components, CC)及 KEGG 信号通路,整理后导入 Cytoscape 3.7.1 软件进一步可视化分析。

## 1.5 KEGG Mapper 映射

使用 KEGG Mapper 对富集基因进行基因映射。

## 1.6 L6 细胞体外实验验证

### 1.6.1 细胞株、试剂及仪器

L6 细胞株(中国上海吉凯基因);6-姜辣素(上海源叶生物科技有限公司,货号 B21838);油酸、油红、果糖(美国 Sigma 公司,货号分别为 O1008、O0625、F3510);TG 检测试剂盒(北京普利莱基因技术有限公司,货号 E1013);胎牛血清(美国 Gemini 公司,批号 A58G00J);DMEM 培养基(美国 Gibco 公司,批号 8121437);胰蛋白酶、青/链霉素、RIPA 裂解液、BCA 蛋白浓度测定试剂盒(碧云天生物技术公司,货号:C0201、ST488、P0013B、P0010);RNAiso Plus、转录试剂盒、SYBR Premix(中国大连 TAKARA 公司,货号:9109、RR047A、RR820A);羊抗兔、羊抗鼠、IL-1 $\beta$  抗体(武汉博士德生物工程有限公司,批号:BA1054、BA1050、A00101-1);TNF- $\alpha$  抗体(沈阳万类生物科技有限公司,货号 WL01581)、GAPDH 抗体(美国 Bioworld 公司,货号 AP0063)、AKT 抗

体、p-AKT 抗体、p-mTOR 抗体、ERK 抗体、p-ERK 抗体、p-NF- $\kappa$ B-p65 抗体、 $\beta$ -actin 抗体(美国 CST 公司,货号:3063S、4060S、5536t、4695S、4370S、3033S、4970S);mTOR、NF- $\kappa$ B-p65、PI3K(美国 Abcam 公司,货号:ab2732、ab194921、ab191606)。

垂直电泳装置(型号 Powerpac<sup>TM</sup> Basic,美国 BIO-RAD 公司);Touch RT-PCR 仪(型号 CFX96,美国 BIO-RAD 公司);全自动酶标仪(型号 Syneyy HTX,基因有限公司);高速冷冻离心机(型号 icEN-24R,杭州奥盛仪器有限公司);Odyssey Fc 双色红外荧光成像系统(型号 Odyssey FC,美国 LI-COR 公司);正置荧光显微镜(型号 U-HGLGPS,日本 Olympus 公司)。

### 1.6.2 实验细胞株的培养

L6 大鼠成肌细胞加入 10% 胎牛血清、100 U/mL 青霉素及 0.1 mg/mL 链霉素的 DMEM 培养基置于 37 °C 恒温 5% CO<sub>2</sub> 细胞培养箱培养,待生长至 70% ~ 80% 时,换为含 2% 马血清的 DMEM 培养基进行诱导分化。每隔一天换液培养,待其生长至 80% 长出肌管,说明得到分化成熟的骨骼肌细胞。

### 1.6.3 油红染色

在 24 孔板中铺入生长状态良好的大鼠成肌细胞,待密度为 70% ~ 80%,换为 2% 的马血清培养,待其 80% 长出肌管,对细胞进行饥饿处理 12 h 后,加入含 10% 胎牛血清的培养基进行培养作为对照组(control, Con),加入果糖(25 mmol/L)油酸(100  $\mu$ mol/L)作为模型组(model, M),在其基础上加入 6-姜辣素(10  $\mu$ mol/L)作为给药组(6-gingerol, G),于细胞培养箱孵育;24 h 后取出细胞,PBS 洗 5 次,每次 5 min;多聚甲醛固定 30 min,PBS 再洗 5 次,每次 5 min;异丙醇孵育 2 min,油红染色 17 min,流水冲洗;加入异丙醇分色 20 s,流水冲洗;苏木素染色 30 s,流水冲洗,甘油封片,镜下观察。

### 1.6.4 TG 测定

将生长状态良好的 L6 大鼠成肌细胞种植于 6 孔板,分组情况参照“1.6.3”,按照普利莱 TG 测定试剂盒操作,做 3 次实验重复。

### 1.6.5 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 蛋白水平检测

细胞分组及药物干预按照“1.6.3”,6 孔板培养细胞,药物干预 24 h,弃去培养基,用 PBS 清洗两次,加入胰蛋白酶置于细胞培养箱消化 30 s,培养基终止消化,800 r/min 离心 5 min,加入 PBS 清洗细胞沉淀,重复两次,每孔细胞加入 300  $\mu$ L RIPA 裂解

液,采用 BCA 试剂盒检测蛋白浓度。取蛋白样品上样进行 SDS-PAGE 电泳,转膜后,用含 5% 脱脂奶粉的 TBST 封闭 2 h,封闭结束后,与对应的一抗稀释液 4 ℃ 孵育过夜。第二天用 TBST 洗膜 4 次,每次 10 min。加入辣根过氧化物酶标记的二抗(1:5 000),室温孵育 2 h。孵育结束后,用 TBST 洗膜 4 次,每次 10 min。洗膜完成后,采用 ECL 化学发光显色法显影,实验结果采用 ImageJ 软件进行分析。

表 1 实时荧光定量 PCR 相关基因引物序列  
Table 1 Primer sequences for RT-PCR assays

基因 Gene	正向引物 Forward primer	反向引物 Reverse primer	长度 Length (bp)
PI3K	GCTGTTGATAGACCACCGCTTCC	TGCCCTGTTCTCTGCCCTTCC	110
AKT	CGCCTGCCCTTCTACAACCA	GCCTCTGCTTAGGGTCCTTCTTG	126
mTOR	GTTTGAAGTGAAGCGAGCCT	CGCTGCGTGCTAAGAATCAG	231
ERK	AATTGCTCAGGACAAGGGC	TGGGTAAGCTGAGACGGG	102
NF-κB-p65	TGTATTTTCACGGGACCTGGC	CAGGCTAGGGTCAGCGTATG	110
β-actin	ACGGTCAGGTCATCACTATCG	GGCATACAGGCTCTTACGGATG	127

1.6.7 Western blot 检测 PI3K-AKT 通路相关蛋白表达

参照方法“1.6.5”。

1.6.8 统计学分析

所有数据用 GraphPad Prism 8 软件进行分析,所有数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,多组间比较采用方差分析,两两比较采用  $t$  检验, $P < 0.05$  认为有统计学意义。

2 结果

2.1 6-姜辣素和糖脂代谢紊乱相关靶点的获取

运用 TCMSP 数据库、SwissTargetPrediction 数据库检索 6-姜辣素目标靶点,得到 117 个靶点。通过

1.6.6 RT-PCR 检测 PI3K-AKT 通路相关基因表达  
收集细胞,按照试剂盒提取总 RNA,用 Nano-Drope 2000 检测 RNA 含量和纯度,逆转录为 cDNA,然后按照 10 μL 反应体系,循环条件:95 ℃,30 s 预变性;95 ℃变性 5 s,60 ℃退火延伸 30 s,共 40 个循环检测。以 β-actin 作为内参,数据采用 2<sup>-ΔΔCt</sup> 法对目的基因进行相对定量分析。引物序列详见表 1。

GeneCards 数据库获取糖脂代谢紊乱相关的 14 971 个作用靶点。

2.2 6-姜辣素-糖脂代谢紊乱靶点 PPI 网络构建

将 6-姜辣素的 117 个靶点与糖脂代谢紊乱相关的 14 971 个靶点取交集,绘制 Venn 图得到 113 个共同靶点(见图 1);将交集靶点提交至 STRING 数据库,得到 6-姜辣素靶点 PPI 网络(见图 2)。并按照其“度”值从高到低排序,取其排名前 30 名,关键的靶基因有 TP53、MAPK3、CASP3、mTOR、PI3K(见图 3)。

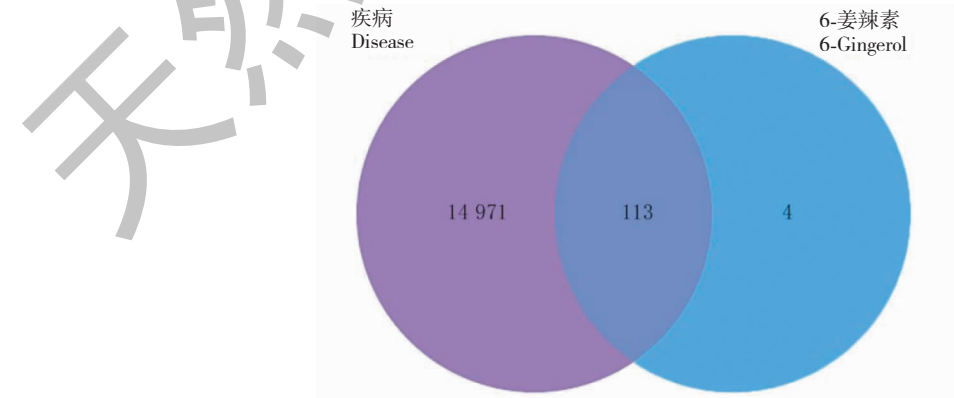


图 1 6-姜辣素靶点与疾病靶点韦恩图

Fig. 1 Venn diagram of 6-gingerol targets and disease targets

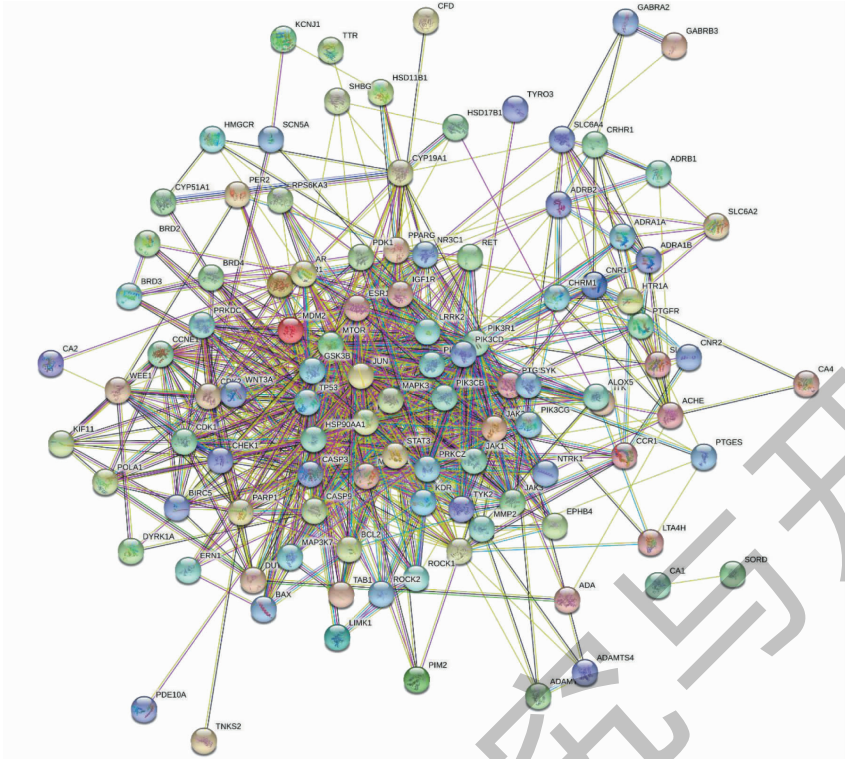


图 2 6-姜辣素靶点与糖脂代谢紊乱靶点的 PPI 网络  
Fig. 2 PPI networks of 6-gingerol and glucolipid metabolic disorders targets

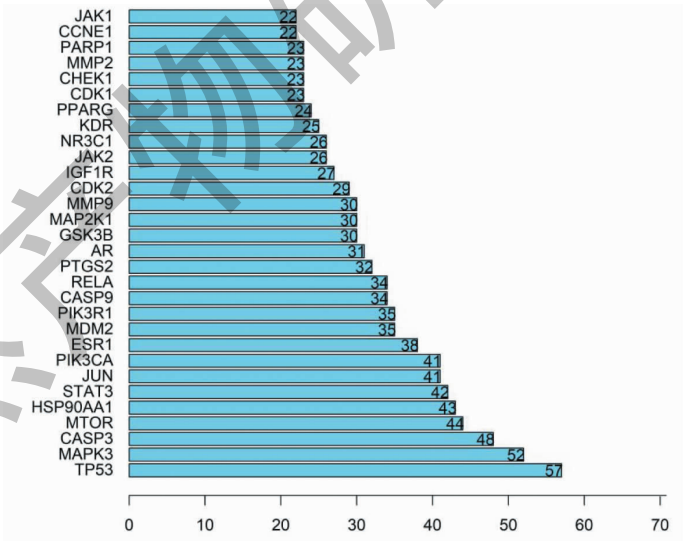


图 3 6-姜辣素与糖脂代谢紊乱靶点交集  
Fig. 3 Intersection of targets of 6-gingerol and glucolipid metabolic disorders

2.3 GO 与 KEGG 富集分析

对 PPI 网络涉及蛋白质进行 GO 和 KEGG 富集分析,结果显示主要参与的生物学过程包括蛋白丝氨酸/苏氨酸激酶活性、蛋白质酪氨酸激酶活性、非跨膜蛋白酪氨酸激酶活性、PI3K 活性 G 蛋白偶联胺

受体活性等;参与的主要分子功能包括胰岛素受体底物结合、磷酸酶结合、激素结合、蛋白磷酸酶结合等;参与的通路主要包括 PI3K-AKT 信号通路、自噬、乙、丙型肝炎、人类巨细胞病毒感染等(见图 4)。



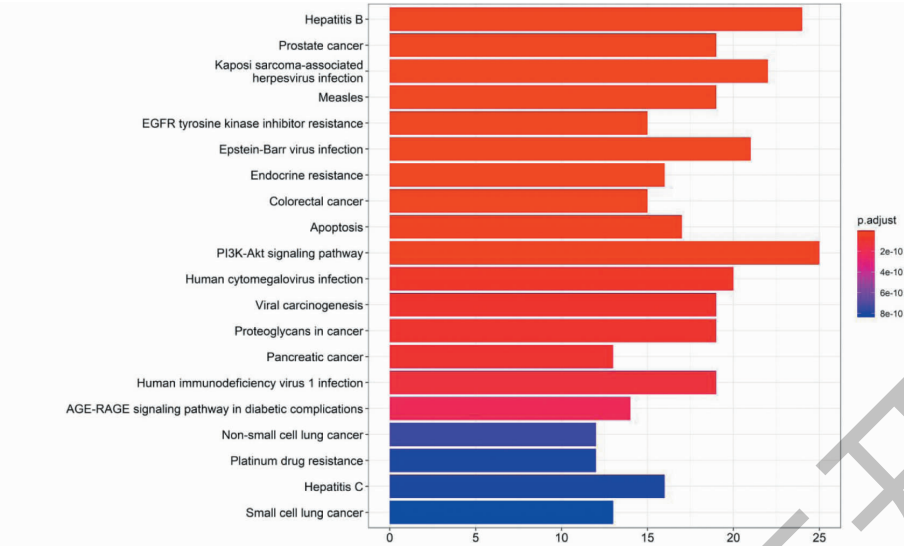


图 4 6-姜辣素治疗糖脂代谢紊乱靶点的 KEGG 富集分析

Fig. 4 KEGG enrichment analysis of the targets of 6-gingerol in the treatment of glucolipid metabolism disorders

2.4 6-姜辣素治疗糖脂代谢紊乱的靶点在 PI3K-AKT 信号通路中的映射

为进一步了解药物靶点的相关性,使用 KEGG Mapper 将有效靶点映射在 PI3K-AKT 信号通路上,

结果表明 6-姜辣素靶向 PI3K-AKT 通路上的 15 个蛋白,包括 PI3K、AKT、mTOR、ERK、NF- $\kappa$ B-p65 等(见图 5)。

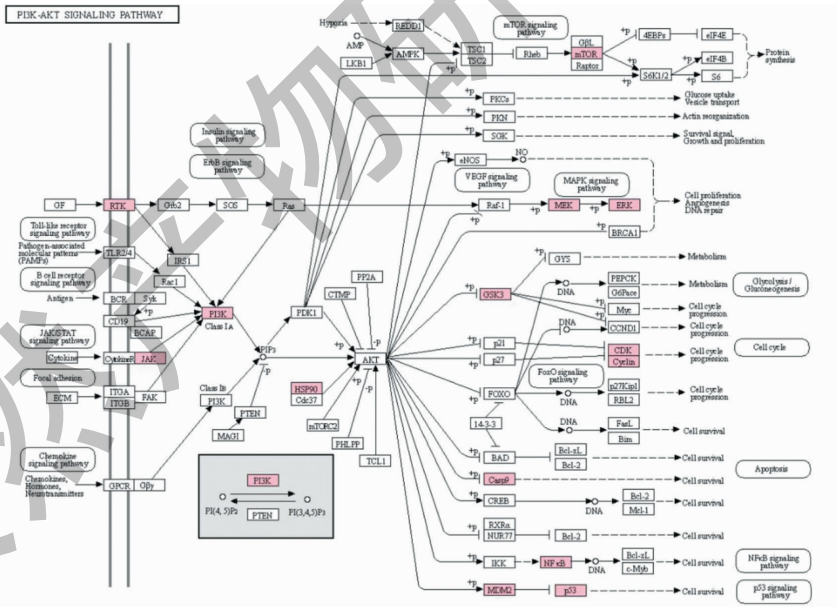


图 5 6-姜辣素治疗糖脂代谢紊乱靶点在 PI3K-AKT 通路中的映射

Fig. 5 The targets of 6-gingerol in the treatment of glucolipid metabolic disorders in the mapping of PI3K-AKT pathway

注:红色背景节点表示 6-姜辣素作用糖脂代谢紊乱的靶点。Note: Red background nodes represent the targets of 6-gingerol in the treatment of glucolipid metabolic disorder.

2.5 TG 测定和油红染色结果

与对照组相比,模型组甘油三酯含量显著增加 ( $P < 0.01$ );与模型组相比,给药组甘油三酯含量明

显降低 ( $P < 0.01$ ),油红染色和甘油三酯变化趋势一致。表明 6-姜辣素可以改善高果糖高油酸造成 L6 细胞的脂质沉积,结果见图 6。

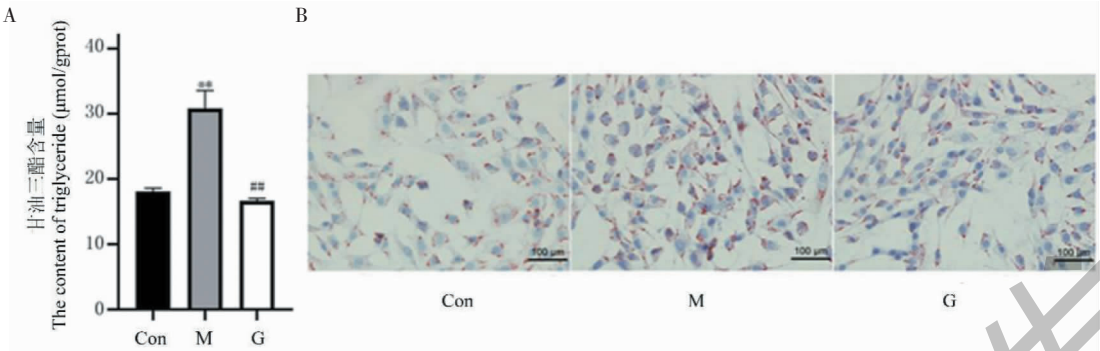


图 6 L6 细胞的 TG 含量和油红染色( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 6 TG content and oil red staining of L6 cells( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

注:A:L6 细胞的甘油三酯含量;B:L6 细胞的油红染色,  $\times 200$ 。与对照组比较,  $*P < 0.05$ ,  $**P < 0.01$ ,  $***P < 0.001$ ;与模型组比较,  $^{\#}P < 0.05$ ,  $^{\#\#}P < 0.01$ ,  $^{\#\#\#}P < 0.001$ ,下同。Note:A:Triglyceride content of L6 cells;B:Oil red staining of L6 cells,  $\times 200$ . Compared with control group,  $*P < 0.05$ ,  $**P < 0.01$ ,  $***P < 0.001$ ;Compared with model group,  $^{\#}P < 0.05$ ,  $^{\#\#}P < 0.01$ ,  $^{\#\#\#}P < 0.001$ . The same as below.

2.6 大鼠成肌细胞的 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  蛋白表达水平

与对照组相比,模型组 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  表达显著上调( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ );与模型组相比,给药组

IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  表达上调( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。提示 6-姜辣素降低了高果糖高油酸引起的 L6 细胞的炎症反应(见图 7)。

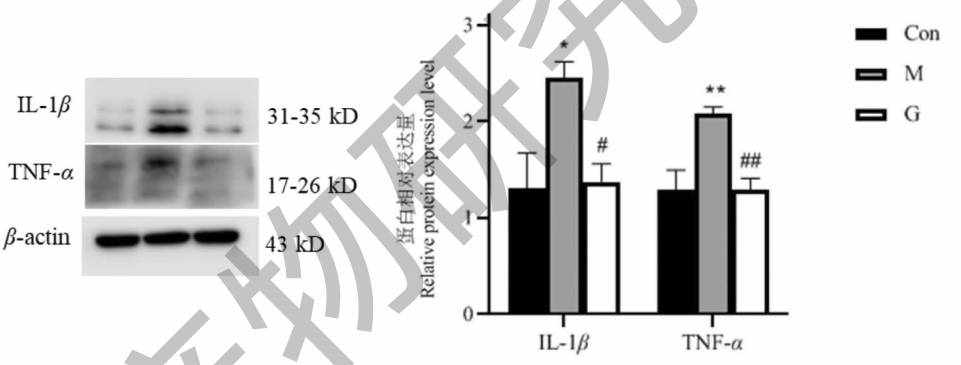


图 7 6-姜辣素对 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  蛋白的影响( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 7 Effects of 6-gingerol on IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$ ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

2.7 6-姜辣素对大鼠成肌细胞 PI3K-AKT 通路相关基因的影响

与对照组相比,AKT 的 mRNA 含量在模型组显著下调( $P < 0.01$ );与模型组相比,给药组 AKT 的 mRNA 含量上调( $P < 0.05$ ),其他基因在模型组和给药组间无差异(见图 8)。

2.8 6-姜辣素对大鼠成肌细胞 PI3K-AKT 通路相关蛋白表达的影响

与对照组相比,模型组 p-AKT 表达显著下调( $P < 0.01$ );与模型组相比,给药组 p-AKT、PI3K 表达上调( $P < 0.05$ )。与对照组相比,p-mTOR、p-ERK、p-NF- $\kappa$ B-p65 表达上调;与模型组相比,给药组 p-mTOR、p-ERK、p-NF- $\kappa$ B-p65 表达下调(见图 9)。

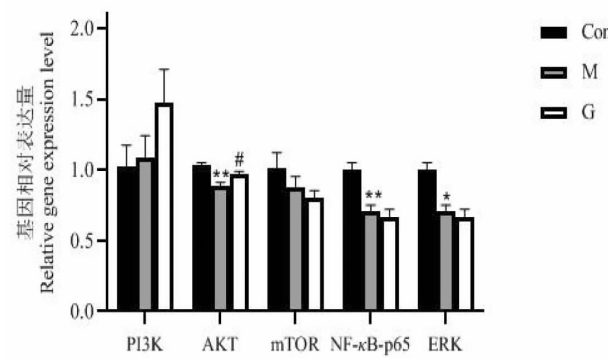


图 8 6-姜辣素对 PI3K-AKT 通路基因水平的影响( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 8 Effects of 6-gingerol on mRNA level of PI3K-AKT pathway( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

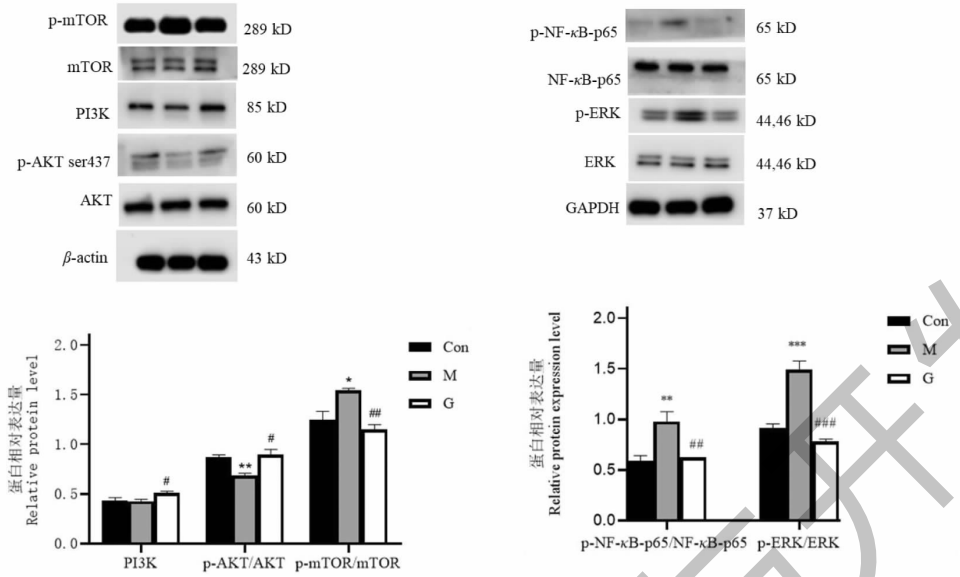


图9 6-姜辣素对 PI3K-AKT 信号通路相关蛋白表达的影响( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 9 Effects of 6-gingerol on protein expression of PI3K-AKT signaling pathway( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

3 讨论与结论

糖脂代谢紊乱是由遗传、环境、精神、饮食等多种因素参与的疾病,其机制主要涉及神经-内分泌-免疫紊乱、胰岛素抵抗、氧化应激、炎症反应、肠道菌群失调等,并以高血糖、血脂失调、脂肪肝、超重、高血压、动脉粥样硬化等单一或合并出现为主要临床表现<sup>[15]</sup>。本研究通过构建 6-姜辣素-糖脂代谢紊乱基因调控网络,发现 PI3K-AKT 信号通路与 6-姜辣素靶点密切相关,进一步通过基因映射发现 PI3K-AKT 通路、mTOR、ERK、NF-κB-p65 可能是 6-姜辣素发挥作用的重要靶点。

PI3K-AKT 信号通路是胰岛素作用下激活的主要信号转导通路,胰岛素激活该通路后,诱导其下游蛋白级联反应,参与糖脂代谢<sup>[16]</sup>。PI3K 激活 AKT, AKT 磷酸化下游底物,这些底物参与调节多种细胞功能,包括凋亡、代谢和细胞周期进程<sup>[17]</sup>。当机体处于 IR 状态时,该信号通路的转导也受到影响,相关功能转导途径减弱或受阻,通路中胰岛素受体底物(IRS)、PI3K、AKT 蛋白质磷酸化水平表达下调。PI3K-AKT 通路受损与肥胖的发展和糖脂代谢紊乱有关。本研究结果显示,与对照组相比,模型组 AKT 基因水平和蛋白磷酸化下调;与模型组相比,给药组 AKT 基因水平、蛋白磷酸化水平上调;PI3K 基因在各个组间无明显差异,与模型组相比,给药组 PI3K 蛋白水平显著上调。这提示 6-姜辣素可能通过调节 PI3K-AKT 通路克服胰岛素信号通路的损伤

改善糖脂代谢紊乱。mTOR 是一种 289 kD 丝氨酸/苏氨酸激酶,是 PI3K-AKT 的下游通路<sup>[18]</sup>,是细胞生长所必需的营养物质和代谢过程之间的重要分子连接。研究表明<sup>[19]</sup>,在高脂环境中,mTOR 的磷酸化水平升高,抑制 mTOR 的磷酸化能够促进自噬信号通路的激活改善胰岛素抵抗,从而改善糖脂代谢紊乱。Yu 等<sup>[20]</sup>证明 6-姜辣素抑制 p-mTOR 的表达。本研究结果显示,与对照组相比,模型组 p-mTOR 上调;与模型组相比,给药 p-mTOR 下调,提示 6-姜辣素可能抑制 mTOR 的磷酸化来改善糖脂代谢紊乱。

Nishi 等<sup>[21]</sup>发现长期的脂质代谢失衡会导致外周器官异位脂肪分布(脂毒性),包括肾脏、心脏和骨骼肌,从而加速外周炎症和疾病。研究表明,脂质在骨骼肌的异位沉积能促进炎症的发生<sup>[22]</sup>。近年来,越来越多的证据表明,慢性低度炎症与糖脂代谢紊乱(如胰岛素抵抗、明显肥胖和 2 型糖尿病)之间存在潜在联系,这些疾病与炎症因子产生异常有关。炎症细胞因子水平升高可影响胰岛素和脂质信号分子,从而引起糖脂代谢紊乱。Longo 等<sup>[23]</sup>亦发现可通过改善组织中的炎症和胰岛素敏感性改善糖脂代谢紊乱。研究表明<sup>[24]</sup>,炎症细胞因子的基因转录及表达需要活化核转录因子 κB(NF-κB),其中 NF-κB 的活化与丝裂原活化蛋白激酶(mitogenactivated protein kinase, MAPK)有关。NF-κB 是与氧化应激相关的真核细胞转录因子,p65 是涉及 NF-κB 激活



的一个重要亚基<sup>[25]</sup>。激活的 NF- $\kappa$ B 进入细胞核并诱导许多基因的表达,这些基因涉及先天性和适应性免疫调节、细胞粘附、炎症反应和抗细胞凋亡机制<sup>[26]</sup>。MAPK 通路在炎症反应中扮演着重要角色,其中包括 p38 MAPK、ERK 介导的级联反应,该信号通路的激活与 NF- $\kappa$ B 通路激活引起的 TNF- $\alpha$  等炎症因子的释放增多有关,从而加剧炎症反应<sup>[27]</sup>。目前多个体内体外试验均表明生姜的有效成分通过抑制 NF- $\kappa$ B、MAPK 磷酸化发挥强大的抗炎作用<sup>[28]</sup>,NF- $\kappa$ B 能够介导调节多种炎症介质,包括 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-8 等。研究亦证明从食用生姜中提取的 6-姜辣素具有抗炎作用<sup>[29]</sup>。本研究发现,与对照组相比,模型组中 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、p-ERK、p-NF- $\kappa$ B-p65 蛋白水平上调;给药后逆转了这一情况,表明 6-姜辣素可能通过调控 ERK、NF- $\kappa$ B-p65 的翻译后水平,阻断促炎因子 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ ,降低炎症反应改善糖脂代谢紊乱。

综上所述,6-姜辣素能够抑制 ERK、NF- $\kappa$ B-p65 蛋白的磷酸化从而降低炎症反应并通过调控 PI3K/AKT/mTOR 轴改善胰岛素抵抗。本研究阐明了 6-姜辣素治疗糖脂代谢紊乱的潜在作用靶点,为 6-姜辣素的临床应用提供了理论基础。

## 参考文献

- 1 Zhao L, Cang Z, Sun H, et al. Berberine improves glucogenesis and lipid metabolism in nonalcoholic fatty liver disease [J]. BMC Endocr Disord, 2017, 17(1): 13.
- 2 Zhou XM, Tian CY, La XJ, et al. Effect of water extract of Shizidaiping prescription on insulin resistance of skeletal muscle cells [J]. Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发), 2016, 28: 1139-1143.
- 3 Xiao Jie, Ying J, Hou C, et al. Effects of fermented pericarpium citri reticulatae dark tea on the mice regulation of glucose metabolism and lipid metabolism dysfunction induced by high-fat diet [J]. Food Sci (食品科学), 2021, 12: 1-13.
- 4 Tang S, Wu W, Tang W, et al. Suppression of rho-kinase 1 is responsible for insulin regulation of the AMPK/SREBP-1c pathway in skeletal muscle cells exposed to palmitate [J]. Acta Diabetol, 2017, 54: 635-644.
- 5 Chriett S, Zerzaihi O, Vidal H, et al. The histone deacetylase inhibitor sodium butyrate improves insulin signalling in palmitate-induced insulin resistance in L6 rat muscle cells through epigenetically-mediated up-regulation of Irs1 [J]. Mol Cell Endocrinol, 2017, 439: 224-232.
- 6 Liu L, Yao L, Wang S, et al. 6-Gingerol improves ectopic lip-

id accumulation, mitochondrial dysfunction, and insulin resistance in skeletal muscle of ageing rats; dual stimulation of the AMPK/PGC-1 $\alpha$  signaling pathway via plasma adiponectin and muscular adipon1 [J]. Mol Nutr Food Res, 2019, 63(6): e1800649.

- 7 Pournaderi PS, Yaghmaei P, Khodaei H, et al. The effects of 6-Gingerol on reproductive improvement, liver functioning and cyclooxygenase-2 gene expression in estradiol valerate-induced polycystic ovary syndrome in wistar rats [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2017, 484: 461-466.
- 8 Algandaby MM, El-Halawany AM, Abdallah HM, et al. Gingerol protects against experimental liver fibrosis in rats via suppression of pro-inflammatory and profibrogenic mediators [J]. Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol, 2016, 389: 419-428.
- 9 Saravanan G, Ponmurugan P, Deepa MA, et al. Anti-obesity action of gingerol: effect on lipid profile, insulin, leptin, amylase and lipase in male obese rats induced by a high-fat diet [J]. J Sci Food Agr, 2014, 94: 2972-2977.
- 10 Ru J, Li P, Wang J, et al. Tcmisp: a database of systems pharmacology for drug discovery from herbal medicines [J]. J Cheminform, 2014, 6: 13.
- 11 Gfeller D, Grosdidier A, Wirth M, et al. Swisstargetprediction: a web server for target prediction of bioactive small molecules [J]. Nucleic Acids Res, 2014, 42(W1): W32-W38.
- 12 Wang Y, Xiao J, Suzek TO, et al. Pubchem's bioAssay database [J]. Nucleic Acids Res, 2011, 40(D1): D400-D412.
- 13 Apweiler R, Bairoch A, Wu CH, et al. Uniprot: the universal protein knowledgebase [J]. Nucleic Acids Res, 2017, 45(D1): D158-D169.
- 14 Stelzer G, Rosen N, Plaschkes I, et al. The genecards suite: from gene data mining to disease genome sequence analyses [J]. Curr Protoc Bioinform, 2016, 54(1): 1-33.
- 15 Guo J. Research progress on prevention and treatment of glucolipid metabolic disease with integrated traditional chinese and western medicine [J]. Chin J Integr Med, 2017, 23: 403-409.
- 16 Engin A. Non-alcoholic fatty liver disease [J]. Adv Exp Med Biol, 2017, 960: 443-467.
- 17 Huang X, Liu G, Guo J, et al. The PI3K/AKT pathway in obesity and type 2 diabetes [J]. Int J Biol Sci, 2018, 14: 1483-1496.
- 18 Zhou H, Huang S. The complexes of mammalian target of rapamycin [J]. Curr Protein Pept Sci, 2010, 11: 409-424.
- 19 Su Z, Zeng K, Feng B, et al. Kun-dan decoction ameliorates insulin resistance by activating AMPK/mTOR-mediated autophagy in high-fat diet-fed rats [J]. Front Pharmacol, 2021,

- 12;670151.
- 20 Yu JB, Shao MJ. Effects of 6-gingerol on proliferation and apoptosis of human breast cancer cells and its mechanism[J]. Chin J Gerontol(中国老年学杂志), 2019, 39;4072-4075.
- 21 Nishi H, Higashihara T, Inagi R. Lipotoxicity in kidney, heart, and skeletal muscle dysfunction[J]. Nutrients, 2019, 11(7);1664.
- 22 Liu XQ. Advances in the role of lipid redistribution in target organ damage[J]. Chin J Obes Metab Dis(中华肥胖与代谢病电子杂志), 2021, 7(1);60-63.
- 23 Longo M, Zatterale F, Naderi J, et al. Adipose tissue dysfunction as determinant of obesity-associated metabolic complications[J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(9);2358.
- 24 Fischer A, Gluth M, Pape UF, et al. Adalimumab prevents barrier dysfunction and antagonizes distinct effects of TNF- $\alpha$  on tight junction proteins and signaling pathways in intestinal epithelial cells[J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2013, 304(11);G970-G979.
- 25 Napetschnig J, Wu H. Molecular basis of NF- $\kappa$ B signaling[J]. Annu Rev Biophys, 2013, 42;443-468.
- 26 Vallabhapurapu S, Karin M. Regulation and function of NF- $\kappa$ B transcription factors in the immune system[J]. Annu Rev Immunol, 2009, 27;693-733.
- 27 Dasgupta P, Kulkarni P, Bhat NS, et al. Activation of the Erk/MAPK signaling pathway is a driver for cadmium induced prostate cancer[J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2020, 401;115102.
- 28 Wang Z, Jiang W, Zhang Z, et al. Nitidine chloride inhibits LPS-induced inflammatory cytokines production via MAPK and NF- $\kappa$ B pathway in RAW 264.7 cells[J]. J Ethnopharmacol, 2012, 144(1);145-150.
- 29 Liu Y, Deng S, Zhang Z, et al. 6-Gingerol attenuates microglia-mediated neuroinflammation and ischemic brain injuries through Akt-mTOR-STAT3 signaling pathway[J]. Eur J Pharmacol, 2020, 883;173294.

## 一种维生素 E 长链代谢物可缓解过敏原致敏小鼠的哮喘

哮喘是一种慢性气道疾病,其特征是可逆性气道阻塞、气道高反应性、慢性炎症和粘液产生。流行病学研究表明,孕期母体营养与儿童期哮喘的发生有关,母体维生素 E 的摄入以及中度哮喘儿童服用维生素 E 有助于改善呼吸和预防哮喘,这与维生素 E 的抗氧化特性和免疫调节作用有关。维生素 E 的抗炎作用部分来自于  $\alpha$ -T 的内源性长链代谢物(LCM)。最近, $\alpha$ -13'-羧基色甘醇( $\alpha$ -T-13'-COOH)被证明是一种在血浆中以低纳摩尔浓度存在到的 LCM,会在炎症部位的免疫细胞内积聚,有效调节过敏原诱导的高反应性,从作为先导结构的内源性 LCM 开始, $\alpha$ -T-13'-COOH 衍生物  $\alpha$ -amplexichromanol( $\alpha$ -AC)已被确定具有显著的体外和体内抗炎活性。

基于上述证据,来自意大利那不勒斯费德里科二世大学医学与外科学院的 Ida Cerqua 及其团队研究了  $\alpha$ -T-13'-COOH 和  $\alpha$ -AC 在实验性哮喘小鼠模型中的作用。腹腔注射  $\alpha$ -T-13'-COOH 和  $\alpha$ -AC 可降低卵清蛋白诱导的气道高反应性和支气管周围炎性细胞浸润, $\alpha$ -AC 比  $\alpha$ -T-13'-COOH 更有效,且这两种化合物都通过降低肺内白三烯 C4 水平发挥保护作用。代谢脂质组学分析显示, $\alpha$ -AC 可提高肺中前列腺素及其降解产物和 12/15 脂氧合酶代谢物的含量。该研究明确了 LCM 和维生素 E 衍生物作为改善哮喘特征的药理活性化合物的作用,并确定了内源性维生素 E 代谢物在调节致敏过程基础免疫反应中的重要作用。相关研究发表在《Pharmacological Research》杂志上。

胡乃华编译自:<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1043661822001955>

原文标题:A vitamin E long-chain metabolite and the inspired drug candidate  $\alpha$ -amplexichromanol relieve asthma features in an experimental model of allergen sensitization