

# 基于网络药理学和实验验证探讨海巴戟 抗动脉粥样硬化的作用机制

张哲<sup>1</sup>, 王蓓<sup>2</sup>, 唐根云<sup>3</sup>, 饶利兵<sup>3</sup>, 林玲<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>广州医科大学研究生院, 广州 510000;

<sup>2</sup>三亚中心医院(海南省第三人民医院), 三亚 572000; <sup>3</sup>湖南医药学院, 怀化 418000

**摘要:**运用网络药理学探究海巴戟治疗动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)的机制及实验验证研究。利用 CMAUP、TCMSP、SwissADME 数据库检索并筛选海巴戟的活性成分, 分别在 GeneCards、OMIM、TTD、PharmGKB 及 Drugbank 数据库中设置筛选条件检索去重后得到 AS 靶点。通过 STRING 数据库构建蛋白互作网络(PPI), 采用 R 语言对交集靶点进行 GO 和 KEGG 富集分析。构建 THP-1 源性巨噬细胞模型进行体外实验验证, 通过 CCK-8 实验筛选海巴戟给药浓度, 采用油红 O 染色和 22-NBD-Cholesterol 细胞荧光方法检测海巴戟干预后模型细胞内胆固醇含量的变化, 再使用 RT-PCR、WB 实验检测和验证所预测的信号通路。结果显示从海巴戟中共筛选出活性成分 59 个, 靶点 332 个, 参与治疗 AS 的交集靶点 154 个, 包括 PPARG、MMP9、IL-6、CCL2 等; GO 富集分析得到 2 844 个条目, 前 10 个条目主要包括调节细胞膜受体与核受体等生物学功能, KEGG 富集分析得到 182 个条目, 前 20 个条目主要包括脂质代谢与动脉粥样硬化、过氧化物酶体增殖物激活受体(PPAR)信号通路等。在验证实验中, 首先利用 CCK-8 实验筛选出了合适的海巴戟浓度(10、20、40  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), 油红 O 染色和 22-NBD-Cholesterol 细胞荧光结果显示海巴戟可促进 THP-1 源性巨噬细胞内胆固醇流出, 且呈剂量依赖性; RT-PCR、WB 结果显示海巴戟可激活 PPAR $\gamma$  信号通路, 增加 PPAR $\gamma$  和 ATP 结合盒转运蛋白 A1(ABCA1)的表达。GW9662 阻断 PPAR $\gamma$  信号通路后海巴戟促进 THP-1 源性巨噬细胞内胆固醇的流出能力下降, 且 PPAR $\gamma$  和 ABCA1 表达随之下调。因此, 运用网络药理学结合实验验证揭示海巴戟可能通过激活 PPAR $\gamma$  信号通路促进 THP-1 源性巨噬细胞胆固醇的流出而改善 AS。

**关键词:**海巴戟; 网络药理学; 过氧化物酶体增殖物激活受体  $\gamma$ ; 胆固醇逆转运; 动脉粥样硬化

中图分类号: 285.5

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2023)11-1977-14

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2023.11.016

## Mechanism of *Morinda citrifolia* against atherosclerosis based on network pharmacology and experiment verification

ZHANG Zhe<sup>1</sup>, WANG Bei<sup>2</sup>, TANG Gen-yun<sup>3</sup>, RAO Li-bing<sup>3</sup>, LIN Ling<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Graduate School of Guangzhou Medical University, Guangzhou 510000, China;

<sup>2</sup>Sanya Central Hospital (Hainan Third People's Hospital), Sanya 572000, China;

<sup>3</sup>Hunan University of Medicine, Huaihua 418000, China

**Abstract:** To investigate the mechanism and experimental verification of *Morinda citrifolia* in the treatment of atherosclerosis (AS) via network pharmacology. CMAUP, TCMSP and SwissADME databases were used to search and screen the active ingredients of *M. citrifolia*. The AS targets were obtained after setting screening conditions in GeneCards, OMIM, TTD, PharmGKB and Drugbank databases. The protein interaction network (PPI) was constructed using STRING database, and the GO function enrichment analysis and KEGG pathway analysis for intersection targets were performed using R language. The THP-1-derived macrophage model was constructed for *in vitro* experiment verification. The concentration of *M. citrifolia* was screened by CCK-8 assay. Oil red O staining and 22-NBD-Cholesterol fluorescence assay were used to detect the intracellular

收稿日期: 2023-02-09 接受日期: 2023-05-29

基金项目: 海南省自然科学基金(821QN432)

\* 通信作者 Tel: 86-898-38281818; E-mail: linl6@163.com

cholesterol in the model cells following the treatment of *M. citrifolia*. A total of 59 active ingredients, 332 targets and 154 targets associated with AS, such as PPAR $\gamma$ , MMP9, IL-6 and CCL2, were screened from *M. citrifolia*. GO function enrichment analysis obtained 2 844 items, and the top 10 items mainly included biological functions such as regulating cell membrane receptors and nuclear receptors. KEGG pathway analysis obtained 182 items, which of the top 20 items primarily contained lipid metabolism and atherosclerosis, peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) signaling pathway, etc. *In vitro* experiments were performed to validate the appropriate concentration of *M. citrifolia* (10, 20, 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) screened by CCK-8 assay firstly. Oil red O staining and 22-NBD-Cholesterol cell fluorescence found that *M. citrifolia* promoted cholesterol efflux of THP-1-derived macrophages in a dose-dependent manner. Subsequently, RT-PCR and WB assays showed that *M. citrifolia* activated PPAR $\gamma$  signaling pathway and increased the expression of PPAR $\gamma$  and ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1) significantly. The capability of *M. citrifolia* to promote cholesterol efflux in THP-1-derived macrophages was decreased dramatically, and the levels of PPAR $\gamma$  and ABCA1 were down-regulated after blunting PPAR $\gamma$  signaling pathway by GW9662, PPAR $\gamma$  inhibitor. Therefore, network pharmacology combined with experimental validation *in vitro* indicated that *M. citrifolia* could ameliorate atherosclerosis by promoting cholesterol efflux from THP-1-derived macrophages via PPAR $\gamma$  signaling pathway.

**Key words:** *Morinda citrifolia*; network pharmacology; PPAR $\gamma$ ; reverse cholesterol transport; atherosclerosis

动脉粥样硬化 (atherosclerosis, AS) 是一种以大、中动脉血管内膜形成粥样斑块或纤维斑块为特征的常见慢性心血管疾病<sup>[1]</sup>。动脉内膜中的脂质渗入现已成为 AS 的主要发病机制<sup>[2]</sup>。聚集在内膜与中膜的巨噬细胞通过细胞膜上的清道夫受体吞噬大量的低密度脂蛋白 (oxidized low density lipoprotein, ox-LDL) 后形成泡沫细胞, 驱动细胞释放大量的促炎因子、基质金属蛋白酶于细胞间隙, 促使动脉管壁中的斑块蓄积增加, 进而转为不稳定斑块, 最终进展为心肌梗死<sup>[2]</sup>。然而有效延缓 AS 的进展一直是困扰学术界的难题之一。近年来备受欢迎的新兴药食同源之品海巴戟被证明其有良好地调节血脂, 改善 AS 的作用<sup>[3]</sup>。

海巴戟 (*Morinda citrifolia*), 又称诺丽 (Noni) 为茜草科巴戟天属植物, 具有抗炎、抗氧化、降脂等药理作用<sup>[4]</sup>。根据中医理论, 海巴戟药味酸、甘, 药性平和, 有补益肾精、平补阴阳及延缓衰老之功效, 可有效预防心脑血管疾病<sup>[5]</sup>。然而, 海巴戟治疗 AS 的具体机制尚不清楚。鉴于海巴戟的化学成分复杂, 其主要由蒽醌类、黄酮类、苯丙素类、酚酸类等成分组成<sup>[7]</sup>, 符合传统中药的多成分、多靶点的特点, 因此使用网络药理学可较清楚地阐述海巴戟发挥药理作用的分子机制。近年来网络药理学是一门以计算机科学、生物信息学及数据挖掘为一体的新兴学科, 它通过构建“药物-有效成分-疾病靶点-疾病”网络, 并对该网络进行生物学功能解释, 使人们更加清楚地认识到药物治疗疾病的机制机理<sup>[6]</sup>。本研究基于海巴戟有效成分多样, 作用靶点丰富的特点, 拟

采用网络药理学方法, 对海巴戟治疗 AS 的靶点、生物学过程、信号通路预测和分析, 同时采用体外实验进行验证, 以期为治疗 AS 的药物开发和治疗提供药理学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞与主要试剂

THP-1 细胞 (货号: CL-0233, 武汉普诺赛生命科技有限公司); 海巴戟萃取粉 (货号: 0003S, 海南西沙诺丽生物科技有限公司); 胎牛血清 (货号: 10270-106, 美国 Gibco 公司); RPMI1640 培养基 (货号: C11875500BT, 美国 Gibco 公司); 佛波酯 (PMA) (货号: P1585, 批号: SLCD3659, 美国 Sigma); 油红 O 染色试剂盒 (货号: 01391, 美国 Sigma); 人源性氧化低密度脂蛋白 (ox-LDL) (货号: YB-002, 广州奕元生物科技有限公司); CCK-8 试剂盒 (货号: GK10001; GIpBio 公司); 22-NBD-Cholesterol (货号: GC46527, 美国 GIpBio 公司); TRIzol (货号: ER501-01-01, 北京全式金生物技术股份有限公司); cDNA 逆转录试剂盒 (货号: AT311-03, 北京全式金生物技术股份有限公司); PPAR $\gamma$ 、ABCA1 引物 (货号: 007P20220307, 北京擎科生物科技有限公司); 抗 PPAR $\gamma$  抗体 (货号: ab178860, 英国 Abcam 公司); 抗 ABCA1 抗体 (货号: A-7228, 武汉 ABclonal 公司); PPAR $\gamma$  抑制剂 GW9662 (货号: A4300, 美国 APEXBio 公司)。

### 1.2 主要仪器

多功能酶标仪 (美国 BIOTEK 公司); 倒置相差显微镜 (美国 Olympus 公司); 倒置荧光显微镜 (日本 Nikon 公司); 低温高速冷冻离心机 (美国 Thermo

公司);电泳仪(美国 Bio-Rad 公司);转膜仪(美国 Bio-Rad 公司);化学荧光凝胶成像系统(美国 Bio-Rad 公司);PCR 仪(美国 Bio-Rad 公司)。

### 1.3 海巴戟有效成分靶点及疾病靶点收集

在 CMAUP 数据库 (<https://www.bidd.group/CMAUP>) 中利用关键词“*Morinda citrifolia*”检索其有效成分<sup>[7]</sup>。活性成分的筛选:在 CMAUP 数据库的“Ingredient of the Plant”功能区中选择实验已验证的有效成分,其他未经验证的成分以化合物名称或者 SMILES 格式分别在 TCMSP 数据库 (<https://tcmssp-e.com/tcmssp.php>) 和 SwissADME 数据库 (<http://www.swissadme.ch/>) 中筛选。TCMSP 数据库筛选标准为口服生物利用度(oral bioavailability, OB)  $\geq 30\%$ ,且类药性(drug-likeness, DL)  $\geq 0.18$ ;SwissADME 数据库需满足“药代动力学”与“类药性”两个特征。通过文献检索又补充了部分活性成分<sup>[7]</sup>。

疾病靶点的获取借助“GeneCards”(<https://www.genecards.org/>)、“OMIM”(<https://omim.org/>)、“TTD”(<http://db.idrblab.net/>)、“PharmGKB”(<https://www.pharmgkb.org/>)、“DrugBank”(<https://go.drugbank.com/>) 五个数据库,以“atherosclerosis”为关键词在各数据库中检索,其中“GeneCards”中设置筛选条件,即“score” $>1$ 。删除或合并各数据库中检索得到的重复基因。将获取的海巴戟有效成分靶点与疾病靶点取交集,导入 R 语言 4.2.1 中,使用“venn”包作图。

### 1.4 海巴戟治疗 AS 疾病蛋白互作网络(PPI)构建及核心网络筛选

将得到的交集基因导入 STRING 在线数据库构建 PPI,下载同时生成的“.tsv”格式文件导入 Cytoscape 3.7.2 计算各节点的自由度并对其进行可视化操作,然后利用软件中“CytoNCA”插件<sup>[6]</sup>根据“介数”“接近中心性”“自由度”“特征向量”“基于局部平均连接度方法”“网络中心性”6 个拓扑学参数对各个节点评分,经过筛选后得到靶点的核心网络,筛选条件为核心基因均须大于 6 个拓扑参数的中位数分值。

### 1.5 GO 功能富集分析及 KEGG 通路富集分析

使用 R 语言 4.2.1 中“org.Hs.eg.db”“clusterProfiler”及“enrichplot”包计算交集基因的 GO 富集与 KEGG 富集条目,再使用“ggplot2 包”分别作图,其中 GO 富集中的细胞成分(cellular component, CC)、生物学过程(biological process, BP)和分子功

能(molecular function, MF)显示排名前 10 的条目;KEGG 通路富集显示排名前 20 的条目。

## 1.6 体外实验验证

### 1.6.1 分组与造模

先使用 100 ng/mL PMA 预处理 THP-1 细胞 48 h,然后将 THP-1 源性巨噬细胞分为 6 组:正常对照组、模型组、海巴戟低浓度组、海巴戟中浓度组、海巴戟高浓度组、海巴戟高浓度组 + PPAR $\gamma$  抑制剂 GW9662 组。除正常对照组外,其余各组均需与 50  $\mu\text{g/mL}$  ox-LDL 共孵育 48 h;而海巴戟低、中、高浓度组需加入各浓度的海巴戟萃取液(海巴戟萃取液溶于 RPMI1640 培养基中配成海巴戟萃取液)并与 ox-LDL 共孵育 48 h;海巴戟高浓度组 + PPAR $\gamma$  抑制剂 GW9662 组在共孵育前 2 h 加入 10  $\mu\text{mol/L}$  GW9662 预处理;正常对照组使用无血清 RPMI 1640 培养基培养 48 h。

### 1.6.2 CCK-8 实验

取对数生长期的 THP-1 细胞,利用细胞计数板计数,调整细胞浓度每孔  $2 \times 10^4$  个,使用 100  $\mu\text{L}$  含 100 ng/mL PMA 工作液将细胞接种于 96 孔板中,组别设置空白组和海巴戟 8 个不同浓度组(0、10、20、40、80、160、320、640  $\mu\text{g/mL}$ ),其中 0 浓度组为对照组,每组设置 3 个复孔。分别培养 24 h、48 h 后,检测前每孔加入 10  $\mu\text{L}$  CCK-8 试剂后继续于细胞培养箱中培养 2 h。然后使用多功能酶标仪检测 450 nm 波长的吸光值(OD 值),实验重复 3 次。按公式(1)计算细胞存活率。

细胞存活率 =

$$(A_{\text{实验组}} - A_{\text{空白组}}) / (A_{\text{对照组}} - A_{\text{空白组}}) \times 100\% \quad (1)$$

### 1.6.3 油红 O 染色

取灭菌的细胞爬片分别放置于 12 孔板中,将对数生长期的细胞接种于各孔,每孔细胞的数量调整为  $3 \times 10^5$  个,每组设置 2 个复孔。待 PMA 诱导 48 h 后,分别向各组中加入 ox-LDL 及不同浓度的海巴戟共孵育 48 h,弃上清,PBS 溶液洗 3 次。4% 多聚甲醛固定 30 min,PBS 洗 3 次,向每孔中加入 1 mL 的油红 O 工作液并于 37 $^{\circ}\text{C}$  烘箱避光孵育 30 min,60% 异丙醇分色 10 s,PBS 清洗 3 次,待自然晾干后滴加甘油封片,使用倒置荧光显微镜拍照保存。

### 1.6.4 22-NBD-Cholesterol 细胞荧光

将处于对数生长期的各组细胞接种于 96 孔板中,每孔细胞数量调整为  $1 \times 10^4$  个,每组设置 5 个复孔。待各组给药处理完成后,弃去上清,每孔加入

100  $\mu\text{L}$  浓度为 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  22-NBD-Cholesterol 工作液共孵育 24 h, PBS 洗 3 次, 避光条件下迅速于多功能酶标仪测量荧光值和倒置荧光显微镜下拍照保存。

### 1.6.5 RT-PCR 检测各组细胞中 PPAR $\gamma$ 、ABCA1 mRNA 的表达

消化各组加药处理后的细胞, 收集于离心管中, 离心后取上清, PBS 清洗 1 次, 各组加入 0.5 ~ 1 mL 的 TRIzol 冰上裂解 3 min, 分别加入氯仿、异丙醇、无水乙醇离心分离提取总 RNA, 使用 cDNA 逆转录试剂盒逆转录成 cDNA。PCR 反应中模板定量为 1  $\mu\text{g}$ , 2  $\times$  Fine Taq Mix 25  $\mu\text{L}$ , 上游引物、下游引物各 1  $\mu\text{L}$ , 其中引物序列见表 1。PCR 反应经历 94  $^{\circ}\text{C}$  预变性、94  $^{\circ}\text{C}$  变性、56  $^{\circ}\text{C}$  退火、72  $^{\circ}\text{C}$  延伸、72  $^{\circ}\text{C}$  再延伸, 得到扩增后产物。配置 2% 琼脂糖凝胶, 上样后进行 DNA 电泳, 于凝胶成像显影仪拍照, 计算 mRNA 的相对表达量。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

基因 Gene	引物序列 Primer sequence(5'→3')
PPAR $\gamma$	F:TGCACTGGAATTAGATGACAGC R:TCCGTGACAATCTGTCTGAGG
ABCA1	F:GTCCTCTTTCCCGATTATCTGG R:CACTCACTCTCGCTCGCAAT
GAPDH	F:CTCTCCACCTTTGACGCTG R:TCCTCTGTGCTCTGCTGCTG

### 1.6.6 Western blot 检测各组细胞中 PPAR $\gamma$ 、ABCA1 蛋白的表达

向各组加药处理后的 60 mm 细胞培养皿中加入裂解液 100  $\mu\text{L}$  并在冰上裂解 30 min, 收集细胞悬液后离心, 取上清用 BCA 法检测各组蛋白的浓度后

调整各组蛋白浓度一致, 加入上样缓冲液后 100  $^{\circ}\text{C}$  煮沸 10 min 配制成样品。配置 8%、10% 的 SDS-PAGE 凝胶, 电泳, 转膜, 5% 脱脂牛奶封闭 1.5 h, 一抗孵育过夜(抗 PPAR $\gamma$  抗体:1:1 000; 抗 ABCA1 抗体:1:1 000), 次日 TBS-T 洗膜 3 次, 二抗孵育 1 h, 均匀滴加高敏化学发光液后显影, 利用 Image J 软件分析目的条带与内参条带的灰度值, 计算目的条带/内参蛋白的比值。

## 1.7 统计学分析

上述实验分别独立重复 3 次。实验数据使用 SPSS 21.0 软件进行统计学分析, 计量资料使用均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 两组间比较采用独立样本  $t$  检验, 多组间比较采用单因素方差 (one-way ANOVA) 分析, 并使用 Tukey 检验进行组间差异比较, 以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。采用 GraphPad Prism 8 软件进行作图。

## 2 结果

### 2.1 海巴戟有效成分靶点及疾病靶点

在 CAMUP 数据库中得到实验验证的有效成分有 17 个及 73 个疾病靶点, TCMS 数据库、SwissADME 数据库及检索文献去重后共获得有效成分 42 个, 相关疾病靶点 259 个。因此海巴戟中共检索到 59 个有效成分(见表 2), 332 个相关疾病靶点。分别从“GeneCards”“OMIM”“TTD”“PharmGKB”“DrugBank”数据库中检索到 AS 相关靶点为 1 428 个、2 个、35 个、4 个和 45 个, 去重后得到的靶点 1 461 个靶点。与海巴戟有效成分靶点的交集靶点为 154 个(见图 1)。使用 Cytoscape 软件绘制海巴戟有效成分与交集靶点网络图, 根据各节点的“degree”设置节点的颜色, “degree”越高颜色越趋于蓝色(见图 2)。

表 2 海巴戟的有效成分

Table 2 Effective ingredients of *M. citrifolia*

MOL ID	成分 Ingredient	分子式 Molecular formula
MOL000003	甘露醇 Mannitol	C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>
MOL000006	木犀草素 Luteolin	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>6</sub>
MOL000040	羟基甲氧苯并吡喃酮 Scopoletin	C <sub>10</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>
MOL000073	表儿茶酸 (+)-Epicatechin	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>
MOL000098	槲皮素 Quercetin	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>7</sub>
MOL000103	苦味酸 Picric acid	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>
MOL000114	香草酸 Vanillic acid	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>
MOL000131	亚油酸 Linoleic acid	C <sub>18</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>
MOL000216	东莨菪苷 Scopolin	C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> O <sub>9</sub>

续表 2 (Continued Tab. 2)

MOL ID	成分 Ingredient	分子式 Molecular formula
MOL000252	法尼醇 Farnesol	C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O
MOL000263	齐墩果酸 Oleanolic acid	C <sub>30</sub> H <sub>48</sub> O <sub>3</sub>
MOL000296	常春藤素 Hederagenin	C <sub>30</sub> H <sub>48</sub> O <sub>4</sub>
MOL000303	羊脂酸 Caprylic acid	C <sub>8</sub> H <sub>16</sub> O <sub>2</sub>
MOL000339	异菝葜亭 Isoscopoletin	C <sub>10</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>
MOL000346	琥珀酸 Succinic acid	C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> O <sub>4</sub>
MOL000359	$\beta$ -谷甾醇 $\beta$ -sitosterol	C <sub>29</sub> H <sub>50</sub> O
MOL000360	阿魏酸 Ferulic acid	C <sub>10</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub>
MOL000365	丁香脂素 Syringaresinol	C <sub>22</sub> H <sub>26</sub> O <sub>8</sub>
MOL000414	咖啡酸酯 Caffeate	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>
MOL000415	芦丁 Rutin	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>16</sub>
MOL000422	山奈酚 Kaempferol	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>6</sub>
MOL000449	豆甾醇 Stigmasterol	C <sub>29</sub> H <sub>48</sub> O
MOL000476	大黄酚 Physcion	C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>
MOL000481	染料木素 Genistein	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>
MOL000511	乌索酸 Ursolic acid	C <sub>30</sub> H <sub>48</sub> O <sub>3</sub>
MOL000513	3,4,5-三羟基苯甲酸 3,4,5-Trihydroxybenzoic acid	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>5</sub>
MOL000635	香草醛 Vanillin	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>
MOL000675	十八烯酸 Oleic acid	C <sub>18</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>
MOL000748	5-羟甲基糠醛 5-Hydroxymethylfurfural	C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>
MOL001442	叶绿醇 Phytol	C <sub>20</sub> H <sub>40</sub> O
MOL001691	抗坏血酸 Ascorbic acid	C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>6</sub>
MOL001842	松脂醇 Pinoresinol	C <sub>20</sub> H <sub>22</sub> O <sub>6</sub>
MOL002046	己酸 Hexanoic acid	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>2</sub>
MOL002049	4-羟基-3-甲氧基肉桂醛 4-Hydroxy-3-methoxycinnamaldehyde	C <sub>10</sub> H <sub>10</sub> O <sub>3</sub>
MOL002771	维生素 E Vitamin E	C <sub>29</sub> H <sub>50</sub> O <sub>2</sub>
MOL002830	对甲酚 P-cresol	C <sub>7</sub> H <sub>8</sub> O
MOL002836	茴香醛 Anisaldehyde	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>
MOL003135	鸡屎藤次苷 Scandoside	C <sub>11</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>
MOL003178	2,5-二羟基苯甲酸 2,5-Dihydroxybenzoic acid	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>4</sub>
MOL003578	环阿屯醇 Cycloartenol	C <sub>30</sub> H <sub>50</sub> O
MOL003686	水仙苷 Narcissoside	C <sub>28</sub> H <sub>32</sub> O <sub>16</sub>
MOL004328	柚皮素 Naringenin	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>
MOL004348	对羟基苯甲酸甲酯 Methylparaben	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>
MOL004456	七叶树苷 Esculin	C <sub>15</sub> H <sub>16</sub> O <sub>9</sub>
MOL005021	邻苯二甲酸二甲酯 Dimethyl phthalate	C <sub>10</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub>
MOL005125	4-甲氧基苯甲酸 4-Methoxybenzoic acid	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>

续表 2 (Continued Tab. 2)

MOL ID	成分 Ingredient	分子式 Molecular formula
MOL005812	柚皮苷 Naringin	C <sub>27</sub> H <sub>32</sub> O <sub>14</sub>
MOL006142	1,3-二羟基-2-乙氧甲基-9,10-蒽醌 Lucidin ethyl ether	C <sub>17</sub> H <sub>14</sub> O <sub>5</sub>
MOL006162	去甲基虎刺素 Nordamnacanthal	C <sub>15</sub> H <sub>8</sub> O <sub>5</sub>
MOL007563	鹅掌楸树脂酚 B 二甲醚 Yangambin	C <sub>24</sub> H <sub>30</sub> O <sub>8</sub>
MOL007930	橙皮素 Hesperidin	C <sub>28</sub> H <sub>34</sub> O <sub>15</sub>
MOL008143	蓖麻油酸 Ricinoleic acid	C <sub>18</sub> H <sub>34</sub> O <sub>3</sub>
MOL009292	五羟黄酮 Tricetin	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>7</sub>
MOL009537	美商陆素 A Americanin A	C <sub>18</sub> H <sub>16</sub> O <sub>6</sub>
MOL009547	去乙酰基车叶草苷酸 Desacetyl asperulosidic acid	C <sub>16</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub>
MOL009551	异虎耳草素 Isoprincepin	C <sub>27</sub> H <sub>26</sub> O <sub>9</sub>
MOL012254	菜油甾醇 Campesterol	C <sub>28</sub> H <sub>48</sub> O
MOL013087	前胡香豆素 II Peucedanocoumarin II	C <sub>21</sub> H <sub>22</sub> O <sub>7</sub>
MOL013092	北美芹素 Pteryxin	C <sub>21</sub> H <sub>22</sub> O <sub>7</sub>

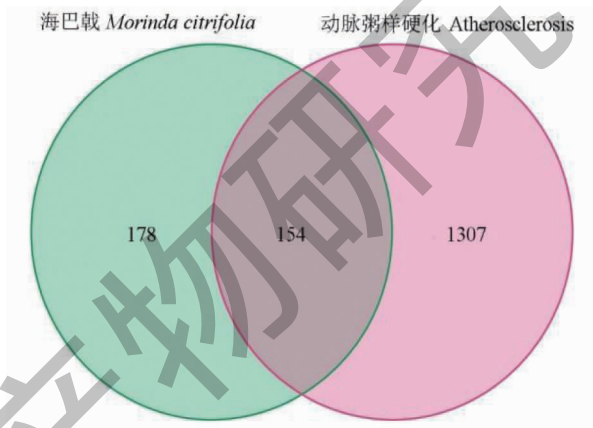


图 1 有效成分与疾病交集靶点

Fig. 1 Intersection targets of active ingredients and disease

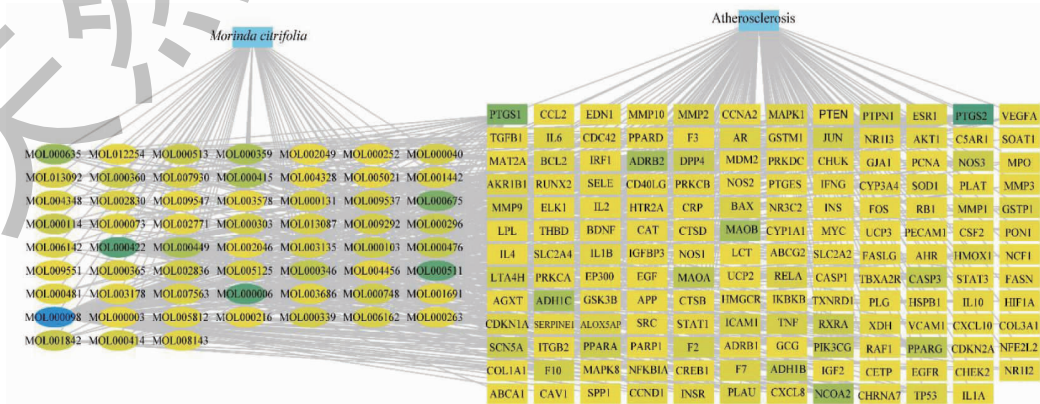


图 2 海巴戟有效成分与交集靶点网络图

Fig. 2 Network diagram of active ingredients of *M. citrifolia* and intersection targets

## 2.2 PPI 构建及核心网络构建

将交集靶点导入 STRING 数据库中在线生成 PPI 图,在 Cytoscape 软件中对其可视化,交集靶点邻接节点个数越多,颜色愈趋于蓝色(见图 3)。使用软件的插件“CytoNCA”对 PPI 网络的核心网络进行筛选,纳入同时大于各项拓扑参数中位数分值的靶点进行下一级分析,共完成两级核心网络创建,最

后得到的核心网络中包含核心节点为 28 个,716 条边(见表 3)。筛选得到的核心靶点相邻节点越多,圆形面积越大且颜色越蓝(见图 4)。值得注意的是,核心网络中含有大量与脂代谢及炎症相关的基因,如 PPARG、MMP9、IL-6、CCL2 等,这些均是促进 AS 发生发展的直接关联基因。

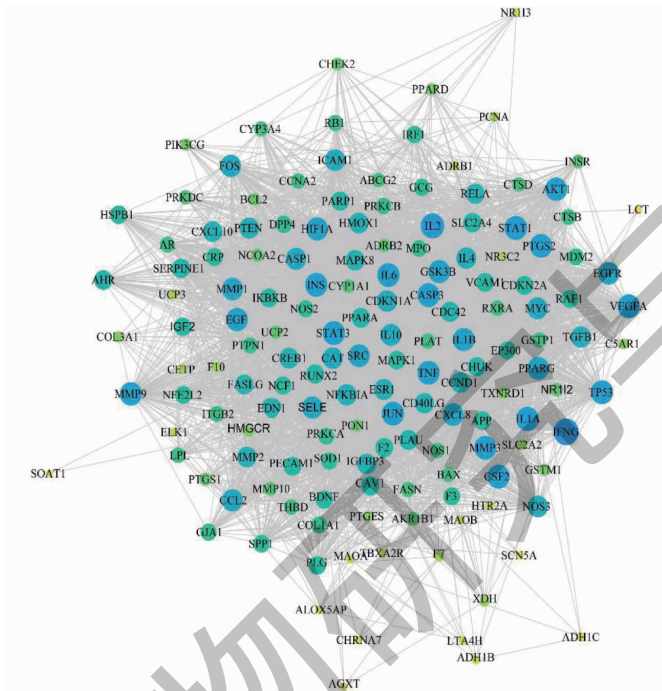


图 3 海巴戟治疗 AS 的蛋白互作网络(PPI)

Fig. 3 PPI network of *M. citrifolia* in the treatment of AS

表 3 核心网络节点拓扑参数

Table 3 Topological parameters of the nodes in the core network

基因 Gene	介数 Betweenness Centrality	接近中心性 Closeness Centrality	自由度 Degree	特征向量 Eigenvector	基于局部平均连接度方法 Local average connectivity- based method	网络中心性 Network Centrality
CXCL8	13.23	0.93	52	0.15	43.42	50.06
EGF	16.12	0.97	54	0.15	44.30	52.88
CCL2	10.80	0.92	51	0.14	43.33	49.01
TGFB1	8.63	0.88	48	0.14	41.29	44.95
VEGFA	19.04	1.00	56	0.15	45.18	56.00
PPARG	15.58	0.95	53	0.15	43.36	51.07
IL10	9.94	0.90	50	0.14	42.76	47.70
HIF1A	15.68	0.97	54	0.15	44.37	52.93
NFKBIA	9.63	0.88	48	0.13	41.00	44.81
FOS	12.96	0.92	51	0.14	42.55	48.50



续表 3 (Continued Tab. 3)

基因 Gene	介数 Betweenness Centrality	接近中心性 Closeness Centrality	自由度 Degree	特征向量 Eigenvector	基于局部平均连接度方法 Local average connectivity- based method	网络中心性 Network Centrality
IL1B	14.92	0.97	54	0.15	44.63	53.10
JUN	19.04	1.00	56	0.15	45.18	56.00
CASP3	19.04	1.00	56	0.15	45.18	56.00
INS	19.04	1.00	56	0.15	45.18	56.00
PTGS2	19.04	1.00	56	0.15	45.18	56.00
STAT3	19.04	1.00	56	0.15	45.18	56.00
MMP9	17.72	0.98	55	0.15	44.65	54.33
NOS3	10.76	0.89	49	0.14	41.35	45.95
SRC	14.42	0.95	53	0.15	43.89	51.46
ICAM1	11.12	0.89	49	0.14	41.27	45.91
CAT	9.46	0.89	49	0.14	41.96	46.18
EGFR	13.87	0.93	52	0.15	43.12	49.91
TNF	19.04	1.00	56	0.15	45.18	56.00
AKT1	17.27	0.98	55	0.15	44.84	54.47
TP53	19.04	1.00	56	0.15	45.18	56.00
IL6	19.04	1.00	56	0.15	45.18	56.00
MYC	12.08	0.90	50	0.14	41.76	47.14

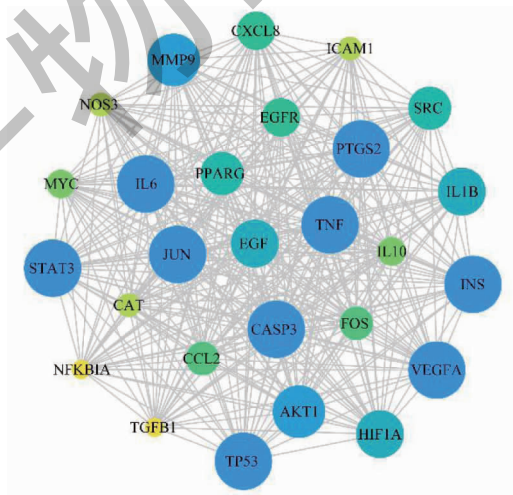


图 4 核心网络拓扑图

Fig. 4 Network topograph for the core network

### 2.3 GO 富集分析与 KEGG 富集分析

GO 功能富集分析得到 2 844 个条目,KEGG 通路富集分析得到 182 个条目。以  $P < 0.05$  为条目的筛选条件,富集得到 GO 的功能主要包括细胞膜受体、核受体等生物学功能(见图 5A)。KEGG 富集通

路主要包括脂质与动脉粥样硬化、PPAR 信号通路等,这些生物学过程均与海巴戟调节脂质异常密切相关,其中过氧化物酶体增殖物激活受体(peroxisome transcriptional proliferator-activated receptors, PPAR)信号通路可能在其中发挥着重要作用(见图 5B)。



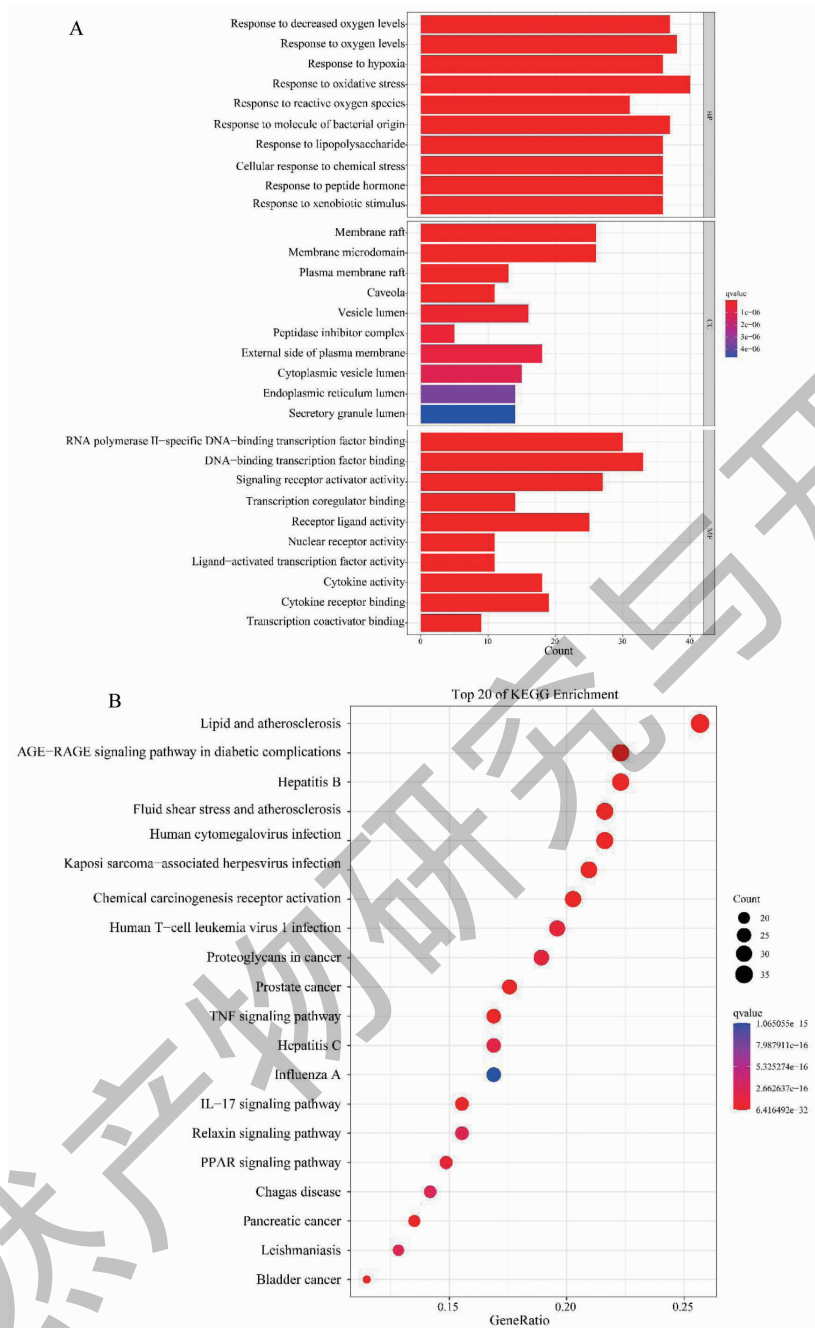


图5 海巴戟调节 AS 靶点的 GO 分析 (A) 和 KEGG 富集分析 (B)

Fig. 5 GO function enrichment analysis (A) and KEGG pathway analysis (B) for AS by *M. citrifolia*

## 2.4 体外实验

### 2.4.1 不同浓度的海巴戟对 THP-1 源性巨噬细胞活性的影响

CCK-8 结果显示,不同浓度(0 ~ 640  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 的海巴戟在 24 h 及 48 h 对细胞活性的影响,在浓度为 320、640  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时,相比于对照组,海巴戟对 THP-1 源性巨噬细胞的毒性作用显著增加 ( $P < 0.05$ ) (见图 6)。海巴戟浓度在 0 ~ 160  $\mu\text{g}/\text{mL}$  对细胞毒性的

作用较小,因此本研究分别选择 10、20、40  $\mu\text{g}/\text{mL}$  作为海巴戟低、中、高浓度组。

### 2.4.2 海巴戟促进 THP-1 源性巨噬细胞胆固醇流出

结果如图 7、表 4 所示,与对照组比较,模型组的脂滴含量与荧光强度显著升高 ( $P < 0.05$ );与模型组比较,海巴戟各浓度组的脂滴含量明显降低,而荧光强度在中、高浓度组显著降低 ( $P < 0.05$ )。

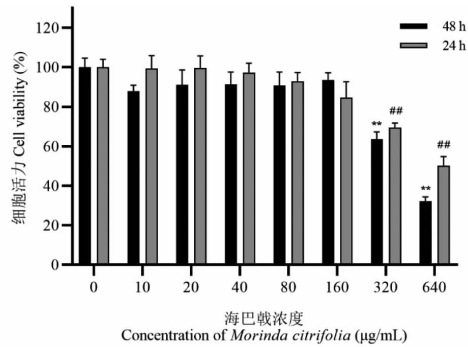


图6 不同浓度的海巴戟对 THP-1 源性巨噬细胞活性的影响

Fig. 6 Effect of different concentrations of *M. citrifolia* on the activity of THP-1-derived macrophages

注:在 24 h 组中,与对照组比较,## $P < 0.01$ ;在 48 h 组中,与对照组比较,\*\* $P < 0.01$ 。Note:In the 24 h group,compared with control group,## $P < 0.01$ ;In the 48 h group,compared with control group,\*\* $P < 0.01$ .

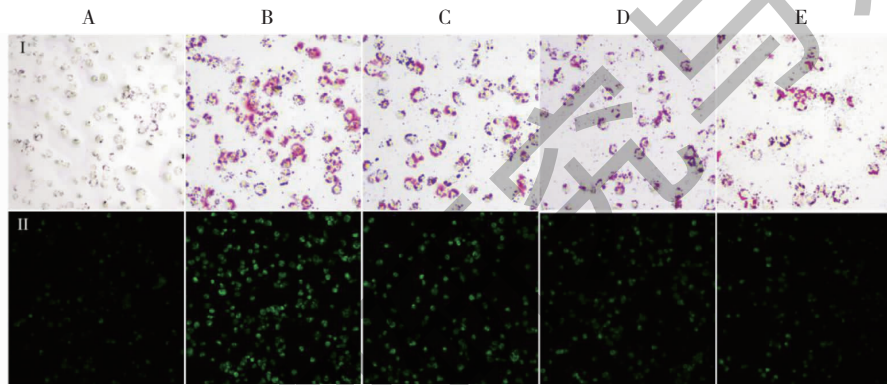


图7 海巴戟干预后对 THP-1 源性巨噬细胞胆固醇流出的影响

Fig. 7 The effect of *M. citrifolia* on cholesterol efflux from THP-1-derived macrophages

注:A.正常对照组;B.模型组;C.海巴戟低浓度组;D.海巴戟中浓度组;E.海巴戟高浓度组(下同)。I:油红O实验(×200);II:22-NBD-Cholesterol 细胞荧光(×200)。Note:A. Control group;B. Model group;C. *M. citrifolia* low dose group;D. *M. citrifolia* medium dose group;E. *M. citrifolia* high dose group (the same below);I:Oil red O staining (×200);II:22-NBD-Cholesterol fluorescence (×200).

表4 海巴戟干预后对 THP-1 源性巨噬细胞胆固醇流出量的影响

Table 4 Effect of *M. citrifolia* on cholesterol efflux from THP-1-derived macrophages after intervention

组别 Group	浓度 Concentration(µg/mL)	荧光相对表达量 Relative fluorescence value
正常对照组 Control group	-	127.00 ± 8.29
模型组 Model group	-	241.67 ± 20.99 <sup>#</sup>
海巴戟低浓度组 <i>M. citrifolia</i> low dose group	10	231.67 ± 9.67
海巴戟中浓度组 <i>M. citrifolia</i> medium dose group	20	201.33 ± 0.47 <sup>*</sup>
海巴戟高浓度组 <i>M. citrifolia</i> high dose group	40	124.00 ± 3.56 <sup>**</sup>

注:与模型组比较,\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$ ;与对照组比较,<sup>#</sup> $P < 0.05$ 。

Note:Compared with the model group,\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$ ;Compared with the control group,<sup>#</sup> $P < 0.05$ .

2.4.3 海巴戟对 THP-1 源性巨噬细胞中 PPAR $\gamma$ 、ABCA1 mRNA 及蛋白表达的影响

结果如图 8 所示,与对照组比较,模型组

PPAR $\gamma$ 、ABCA1 mRNA 表达显著降低(均  $P < 0.05$ );与模型组比较,各浓度海巴戟组的 PPAR $\gamma$ 、ABCA1 mRNA 的表达呈剂量依赖性增加(均  $P <$

0.05)。如图 9 所示,与对照组比较,模型组 PPAR $\gamma$ 、ABCA1 蛋白表达显著降低(均  $P < 0.05$ );

与模型组比较,各浓度海巴戟组的 PPAR $\gamma$ 、ABCA1 蛋白表达呈剂量依赖性增加(均  $P < 0.05$ )。

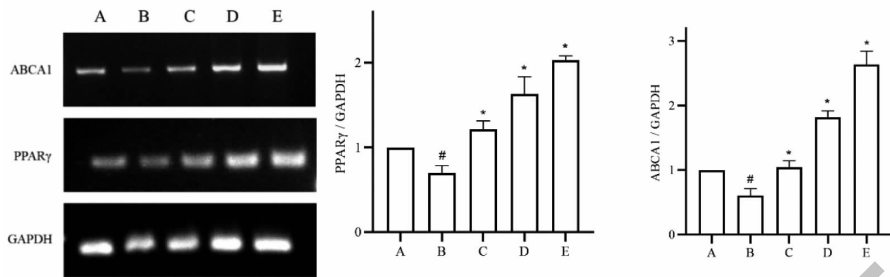


图 8 海巴戟对 THP-1 源性巨噬细胞 PPAR $\gamma$ 、ABCA1 mRNA 表达的影响

Fig. 8 Effect of *M. citrifolia* on the mRNA expression of PPAR $\gamma$  and ABCA1 in THP-1-derived macrophages

注:与模型组比较, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ ;与对照组比较, #  $P < 0.05$ (下同)。Note:Compared with the model group, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ ; Compared with the control group, #  $P < 0.05$ (the same below).

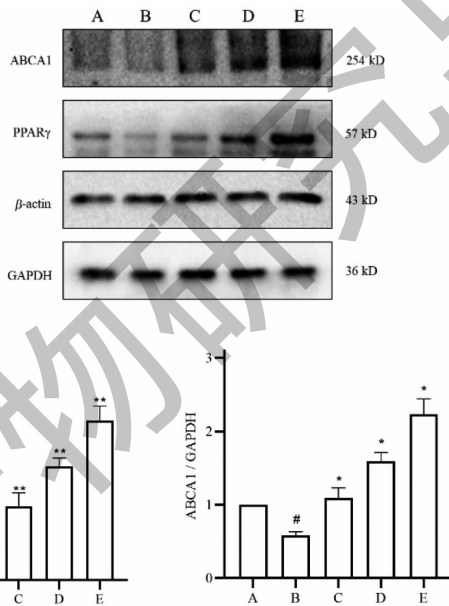


图 9 海巴戟对 THP-1 源性巨噬细胞中 PPAR $\gamma$ 、ABCA1 蛋白的表达的影响

Fig. 9 Effect of *M. citrifolia* on the expression of PPAR $\gamma$  and ABCA1 proteins in THP-1-derived macrophages

2.4.4 海巴戟对 GW9662 预处理 THP-1 源性巨噬细胞后胆固醇流出的影响

结果如图 10 所示,与海巴戟高浓度组比较,海巴戟高浓度组 + GW9662 可显著增加细胞内脂滴含量与荧光强度。结果如图 11 和图 12 所示,与海巴戟高浓度组比较,海巴戟高浓度组 + GW9662 可显著降低 THP-1 源性巨噬细胞 PPAR $\gamma$ 、ABCA1 mRNA 的表达(均  $P < 0.05$ );与海巴戟高浓度组比较,海巴戟高浓度组 + GW9662 可显著降低 THP-1 源性巨噬细胞 PPAR $\gamma$ 、ABCA1 蛋白的表达(均  $P < 0.05$ )。

3 讨论与结论

AS 是一种常见的心血管疾病,其快速进展可直接促使患者发生恶性心血管事件,如心肌梗死等<sup>[1]</sup>。现代医学认为脂质学说仍是 AS 发生的主要机制<sup>[2]</sup>。临床上常使用他汀类、PCSK9 抑制剂等降脂药物来延缓 AS 的进展,但因这些药物在治疗剂量下仍出现如肌肉酸痛、肝功能损害等不良反应,使得许多患者不能耐受<sup>[8]</sup>。因此寻找新型、更安全、低毒的药物来治疗 AS 具有积极意义。海巴戟作为新兴药食同源之品,具有广泛的活性成分与药理作用,

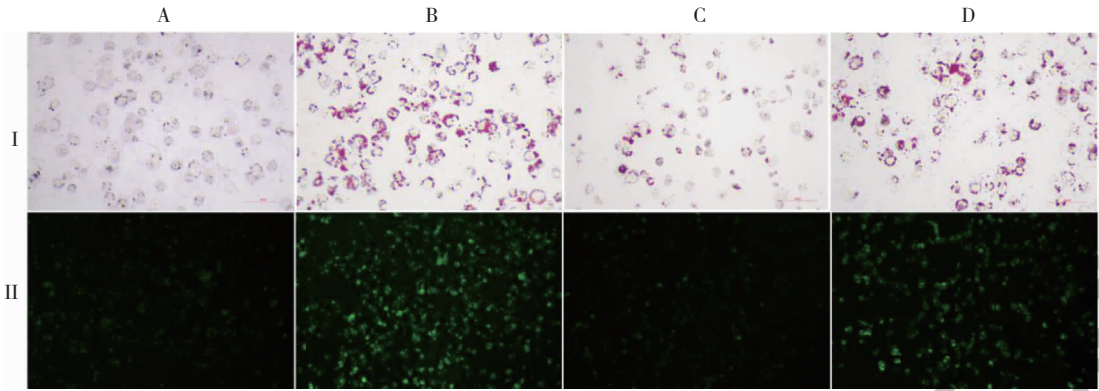


图 10 海巴戟对 GW9662 预处理 THP-1 源性巨噬细胞后胆固醇流出的影响

Fig. 10 The effect of *M. citrifolia* on cholesterol efflux from THP-1-derived macrophages pretreated with GW9662

注: A. 正常对照组; B. 模型组; C. 海巴戟高浓度组; D. 海巴戟高浓度 + GW9662 (下同)。I: 油红 O 实验 ( $\times 200$ ); II: 22-NBD-Cholesterol 细胞荧光 ( $\times 200$ )。Note: A. Control group; B. Model group; C. *M. citrifolia* high dose group; D. *M. citrifolia* high dose + GW9662 group (the same below). I: Oil red O staining ( $\times 200$ ); II: 22-NBD-Cholesterol fluorescence ( $\times 200$ ).

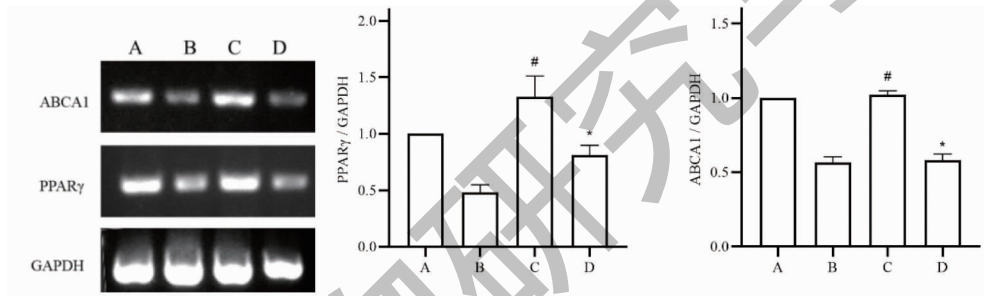


图 11 海巴戟对 GW9662 预处理 THP-1 源性巨噬细胞后 PPAR $\gamma$ 、ABCA1 mRNA 表达的影响

Fig. 11 Effect of *M. citrifolia* on the expression of PPAR $\gamma$  and ABCA1 mRNA in THP-1-derived macrophages pretreated with GW9662

注: 与海巴戟高浓度组比较,  $*P < 0.05$ ; 与模型组比较,  $^{\#}P < 0.05$  (下同)。Note: Compared with *M. citrifolia* high dose group,  $*P < 0.05$ ; Compared with the model group,  $^{\#}P < 0.05$  (the same below).

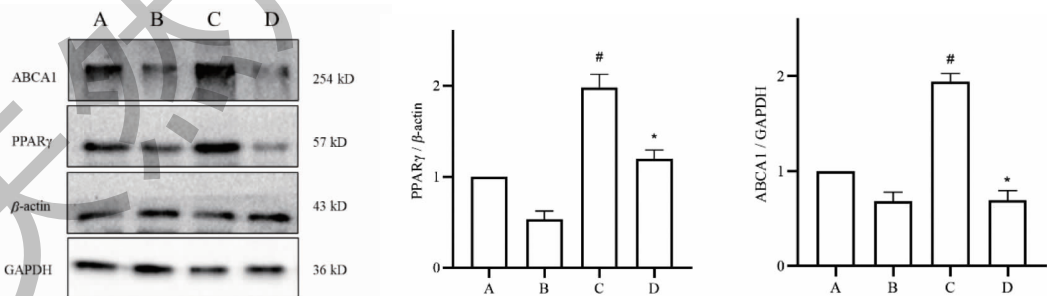


图 12 海巴戟对 GW9662 预处理 THP-1 源性巨噬细胞后 PPAR $\gamma$ 、ABCA1 蛋白表达的影响

Fig. 12 The effect of *M. citrifolia* on the expression of PPAR $\gamma$  and ABCA1 proteins in THP-1-derived macrophages pretreated with GW9662

符合传统中药多靶点、多途径治疗疾病的典型特点。本研究利用网络药理学预测海巴戟治疗 AS 的有效成分及作用靶点,并构建了 THP-1 源性巨噬细胞模

型验证海巴戟通过 PPAR $\gamma$  信号通路促进细胞内胆固醇的流出。

通过多种数据库对海巴戟的有效成分进行筛

选,发现黄酮类、苯丙素类及酚酸类等 59 个化合物主要发挥着治疗 AS 的作用。近年来多项研究报告<sup>[9]</sup>,黄酮类化合物在治疗 AS 中扮演着关键角色,是植物药的主要活性部位。Sahib 等<sup>[10]</sup>研究发现海巴戟果实中儿茶酸、槲皮素与山柰酚的含量分别为 53.68 mg/g、7.4 mg/g、6.4 mg/g,在已知有活性的黄酮类化合物中排名前三位,而这三种成分在调节血脂异常与延缓 AS 中作用显著。研究发现<sup>[11]</sup>,益心通脉颗粒主要成分儿茶酸通过分子对接和体内外实验均证实其能直接激活 PPAR $\gamma$  通路从而改善 AS。槲皮素广泛存在于多种植物中,而在海巴戟中含量占比显著,Jia 等<sup>[12]</sup>和 Li 等<sup>[13]</sup>均报道槲皮素可明显减少高脂饮食诱导 ApoE<sup>-/-</sup>小鼠 AS 模型胸主动脉斑块含量,其机制与 ATP 结合盒转运蛋白 A1 (ATP-binding cassette transporter A1, ABCA1) 表达增加有关。研究证实<sup>[14]</sup>,山柰酚具有较强抗炎活性,能通过激活 PI3K/AKT/Nrf2 通路延缓 AS 进展。

随后在 GO 富集分析中发现,海巴戟主要调节细胞的膜受体以及核受体等生物学功能;KEGG 信号通路富集分析发现海巴戟治疗 AS 与脂代谢相关信号通路有关,而 PPAR 信号通路位列其中。研究表明<sup>[15]</sup>,脂代谢相关信号通路尤其是 PPAR 信号通路与细胞膜的脂质转运体及细胞核内受体关系密切。众所周知,PPARs 是位于细胞核内一类经典的核受体,在接受到第二信使的信号后,通过激活下游转录因子,增加细胞膜上胆固醇转运体的表达,进而减少细胞内胆固醇的聚集,阻碍巨噬细胞演变为泡沫细胞<sup>[16]</sup>。因此 PPAR 信号通路在减少脂核中泡沫细胞的形成及延缓 AS 扮演着重要的角色。此外,在本研究中 *PPARG* 基因亦是成分靶点网络中核心网络的重要节点。

基于上述网络药理学分析,本研究在体外实验构建 THP-1 源性巨噬细胞模拟粥样斑块中泡沫细胞<sup>[12]</sup>,海巴戟干预 THP-1 源性巨噬细胞后发现,细胞内胆固醇含量明显减少,并且细胞内 PPAR $\gamma$  的表达显著上调。Inada 等<sup>[17]</sup>、Nerurkar 等<sup>[18]</sup>分别通过动物实验明确海巴戟的降脂作用。在一项临床研究中发现<sup>[19]</sup>,海巴戟可显著降低重度吸烟受试者血清中 LDL 含量,并升高其高密度脂蛋白 (high density lipoprotein, HDL) 的水平。最近 Chong 等<sup>[3]</sup>证实海巴戟可使热氧化棕榈油饮食诱导的 AS 大鼠模型主动脉中脂质斑块明显减少,但具体机制尚未阐明。早前, Lee 等<sup>[20]</sup>使用 70% 甲醇萃取海巴戟果实干

粉,发现其在 C2C12 骨骼肌细胞中能激动 PPAR $\gamma$  受体,该实验报道与我们结果一致。本研究首次发现海巴戟能促进 THP-1 源性巨噬细胞胆固醇流出,并结合网络药理学预测其通过激活 PPAR $\gamma$  信号通路发挥胆固醇逆转运 (reverse cholesterol transport, RCT) 作用。RCT 系体内调节脂质异常和改善 AS 重要机制之一,可将细胞中的胆固醇经细胞膜上的清道夫受体转出细胞,随后与血浆中的载脂蛋白 apoA、apoE 等结合后运输至肝脏代谢,并转化为胆汁酸排出体外,从而改善脂代谢异常<sup>[21]</sup>。而 ABCA1 作为巨噬细胞膜上重要的清道夫受体,受上游核转录因子 PPAR $\gamma$  的精细调控,通过 RCT 过程负责将细胞内胆固醇转运至细胞外<sup>[16]</sup>。本研究中 ABCA1 的表达水平随 PPAR $\gamma$  的激活而上调,当使用 PPAR $\gamma$  抑制剂 GW9662 时,THP-1 源性巨噬细胞中 ABCA1 受体表达升高趋势受到抑制,同时细胞内胆固醇含量无明显下降,表明 PPAR $\gamma$  介导的 ABCA1 是细胞内胆固醇转运的主要载体。类似地,槲皮素<sup>[12]</sup>、黄芩苷<sup>[22]</sup>和二氢杨梅素<sup>[23]</sup>均可通过激活 PPAR $\gamma$ /ABCA1 信号通路,促进 RCT,发挥抗 AS 的作用。因此,海巴戟能通过激活 PPAR $\gamma$  信号通路促进 THP-1 源性巨噬细胞的胆固醇流出。

综上,海巴戟药味甘、酸,药性平和,可补益肾精、平补阴阳,预防心脑血管疾病。本研究利用网络药理学结合体外实验揭示了海巴戟治疗 AS 的机制,首次证明海巴戟能促进 THP-1 源性巨噬细胞胆固醇流出,并通过激活 PPAR $\gamma$  信号通路促进 RCT。因此本研究为海巴戟有效防治 AS 提供新的药理作用机制。然而本研究仍存在一些局限:(1) 由于 TC-MSP 数据库未纳入植物药海巴戟,因此借助 CAMUP 数据库和 SwissADME 数据库辅助筛选其活性成分。虽然有研究<sup>[24]</sup>亦借助多种数据库联合筛选中药成分,但不同数据库活性成分的筛选标准不同,所以在筛选可靠性方面有待进一步验证;(2) 本研究筛选了 5 种疾病相关数据库,结果显示各数据库中 AS 靶点数目差异较大,可能与每种数据库收录的病种存在差异有关;(3) 本课题组将在体外实验结果基础上,进一步构建 AS 动物模型,从体内实验角度为海巴戟促进 RCT 延缓 AS 提供更加完整的实验依据。

#### 参考文献

- 1 Libby P. The changing landscape of atherosclerosis [J]. *Nature*, 2021, 592: 524-533.

- 2 Kattoor AJ, Kanuri SH, Mehta JL. Role of Ox-LDL and LOX-1 in atherogenesis [ J ]. *Curr Med Chem*, 2019, 26: 1693-1700.
- 3 Chong CLG, Othman F, Hussan F. Vascular protective effects of *Morinda citrifolia* leaf extract on postmenopausal rats fed with thermoxidized palm oil diet: evidence at microscopic level [ J ]. *Int J Vasc Med*, 2018, 2018: 6317434.
- 4 Liu YQ, Tong YP, Lu Y, et al. Research progress on chemical constituents of *Morinda citrifolia* and their pharmacological activities [ J ]. *Chin Tradit Herbal Drugs* ( 中草药 ), 2017, 48: 1888-1905.
- 5 Liu JL, Zhang R, Liu YB, et al. Literature research and discussion of Chinese medicinal properties of *Morinda citrifolia* [ J ]. *China J Chin Mater Med* ( 中国中药杂志 ), 2020, 45: 984-990.
- 6 Jin JY, Chen B, Zhan XY, et al. Network pharmacology and molecular docking study on the mechanism of colorectal cancer treatment using Xiao-Chai-Hu-Tang [ J ]. *PLoS One*, 2021, 16: e0252508.
- 7 Zeng X, Zhang P, Wang YL, et al. CMAUP: a database of collective molecular activities of useful plants [ J ]. *Nucleic Acids Res*, 2019, 47: D1118-D1127.
- 8 Wilkinson MJ, Laffin LJ, Davidson MH. Overcoming toxicity and side-effects of lipid-lowering therapies [ J ]. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 2014, 28: 439-452.
- 9 Fardoun MM, Maaliki D, Halabi N, et al. Flavonoids in adipose tissue inflammation and atherosclerosis: one arrow, two targets [ J ]. *Clin Sci ( Lond )*, 2020, 134: 1403-1432.
- 10 Sahib NG, Hamid AA, Kitts D, et al. The effects of *Morinda citrifolia*, *Momordica charantia* and *Centella asiatica* extracts on lipoprotein lipase and 3T3-L1 preadipocytes [ J ]. *J Food Biochem*, 2011, 35: 1186-1205.
- 11 Zheng S, Huang H, Li Y, et al. Yin-xing-tong-mai decoction attenuates atherosclerosis via activating PPAR $\gamma$ -LXR $\alpha$ -ABCA1/ABCG1 pathway [ J ]. *Pharmacol Res*, 2021, 169: 105639.
- 12 Jia QL, Cao H, Shen DZ, et al. Quercetin protects against atherosclerosis by regulating the expression of PCSK9, CD36, PPAR $\gamma$ , LXR $\alpha$  and ABCA1 [ J ]. *Int J Mol Med*, 2019, 44: 893-902.
- 13 Li SS, Cao H, Shen DZ, et al. Effect of quercetin on atherosclerosis based on expressions of ABCA1, LXR- $\alpha$  and PCSK9 in ApoE(-/-) mice [ J ]. *Chin J Integr Med*, 2020, 26: 114-121.
- 14 Feng Z, Wang CY, Jin Y, et al. Kaempferol-induced GPER upregulation attenuates atherosclerosis via the PI3K/AKT/Nrf2 pathway [ J ]. *Pharm Biol*, 2021, 59: 1106-1116.
- 15 Montaigne D, Butruille L, Staels B. PPAR control of metabolism and cardiovascular functions [ J ]. *Nat Rev Cardiol*, 2021, 18: 809-823.
- 16 Chinetti G, Lestavel S, Bocher V, et al. PPAR-alpha and PPAR-gamma activators induce cholesterol removal from human macrophage foam cells through stimulation of the ABCA1 pathway [ J ]. *Nat Med*, 2001, 7: 53-58.
- 17 Inada AC, Silva GT, Silva L, et al. Therapeutic effects of *Morinda citrifolia* Linn. (Noni) aqueous fruit extract on the glucose and lipid metabolism in high-fat/high-fructose-fed Swiss mice [ J ]. *Nutrients*, 2020, 12: 3439.
- 18 Nerurkar PV, Nishioka A, Eck PO, et al. Regulation of glucose metabolism via hepatic forkhead transcription factor 1 (FoxO1) by *Morinda citrifolia* (noni) in high-fat diet-induced obese mice [ J ]. *Br J Nutr*, 2012, 108: 218-228.
- 19 Wang MY, Peng L, Weidenbacher-Hoper V, et al. Noni juice improves serum lipid profiles and other risk markers in cigarette smokers [ J ]. *Sci World J*, 2012, 2012: 594657.
- 20 Lee SY, Park SL, Hwang JT, et al. Antidiabetic effect of *Morinda citrifolia* (Noni) fermented by cheonggukjang in KK-A(y) diabetic mice [ J ]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2012, 2012: 163280.
- 21 Ouimet M, Barrett TJ, Fisher EA. HDL and reverse cholesterol transport [ J ]. *Circ Res*, 2019, 124: 1505-1518.
- 22 He XW, Yu D, Li WL, et al. Anti-atherosclerotic potential of baicalin mediated by promoting cholesterol efflux from macrophages via the PPAR $\gamma$ -LXR $\alpha$ -ABCA1/ABCG1 pathway [ J ]. *Biomed Pharmacother*, 2016, 83: 257-264.
- 23 Zeng Y, Peng Y, Tang K, et al. Dihydromyricetin ameliorates foam cell formation via LXR $\alpha$ -ABCA1/ABCG1-dependent cholesterol efflux in macrophages [ J ]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 101: 543-552.
- 24 Zhang YH, Yang ML, Zhou XQ, et al. Study on the mechanism of Huangqisan in treating Alzheimer's disease based on network pharmacology and experimental verification [ J ]. *Nat Prod Res Dev* ( 天然产物研究与开发 ), 2022, 34: 2119-2129.