DOI:10.13193/j.issn.1673-7717.2026.03.023

基于PI3K/AKT/NF－κB通路探究加味泽泻汤对高脂饲喂大鼠血管内皮保护作用机制

赫雨薇[1],刘迪[1],官蜀钧[1],宫铭[2],吴文龙[1],李婷[1],张艳[3],赵昕[2]
(1.辽宁中医药大学 辽宁 沈阳 110847;2.大连医科大学附属第二医院,辽宁 大连 116023;
3.辽宁中医药大学附属医院,辽宁 沈阳 110032)

摘要:目的 探讨加味泽泻汤通过磷脂酰肌醇3激酶(PI3K)/蛋白激酶B(AKT)/核因子κB(NF－κB)通路对高脂血症内皮损伤的保护作用及潜在机制探析。方法 将30只SD雄性大鼠(4周龄)随机分为正常组6只,造模组24只,其中造模组24只通过饲喂高脂饮食20周后构建高脂血症模型。将造模成功的24只大鼠随机分为4组,模型组、加味泽泻汤正常剂量组、高剂量组及西药阿托伐他汀钙组。经过4周用药干预后,通过检测大鼠体质量、总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL－C)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL－C)等血脂四项、内皮缩血管肽－1(ET－1)及一氧化氮(NO)等内皮功能相关指标及苏木素－伊红(HE)染色对主动脉组织进行染色后,评价加味泽泻汤治疗高脂血症内皮损伤的治疗效果。随后利用网络药理学分析进一步探究发挥作用的药效机制,通过TCMSP、Swiss Target Prediction、HERB、ETCM和BATMAN数据库预测了中药活性成分及靶点;从GeneCards、OMIM、DisGeNET、TTD数据库中获取了与高脂血症和内皮功能障碍相关的靶点。通过韦恩图及蛋白质－蛋白质相互作用(PPI)网络和富集分析寻找机制通路,并采用实时荧光定量PCR(RT－qPCR)法检测各组大鼠PI3K、AKT1、NF－κB、IL－6、TNF mRNA表达及Western blot法检测内皮损伤通路相关蛋白p－PI3K、PI3K、p－AKT、AKT、NF－κB的表达水平。结果 与正常组比较,模型组大鼠TC、TG、LDL－C、ET－1水平升高($P<0.01$),HDL－C、NO水平降低($P<0.05$,$P<0.01$)。网络药理学分析结果获得加味泽泻汤的活性成分包括24－乙酰泽泻醇A、山柰酚、泽泻醇A、泽泻醇B、泽泻醇C、白术内酯Ⅰ等29个;PPI网络及拓扑分析后共得到IL－6、AKT1、TNF、IL－1B、STAT3等62个核心靶点,富集通路主要涉及PI3K/AKT信号通路、脂质与动脉粥样硬化、HIF－1信号通路、TNF信号通路等156条信号通路。动物实验验证结果显示,与模型组比较,加味泽泻汤可上调PI3K、AKT1、NF－κB、IL－6、TNF等mRNA表达水平,及p－PI3K、PI3K、p－AKT、AKT、NF－κB蛋白表达($P<0.01$)。结论 加味泽泻汤具有良好地降低血脂、抑制炎症因子的表达,保护血管内皮功能的作用,其机制可能是通过激活PI3K/AKT/NF－κB信号通路实现的。

关键词:加味泽泻汤;高脂血症;内皮功能障碍;网络药理学;PI3K/AKT/NFκB通路
中图分类号:R289.5 **文献标志码**:A **文章编号**:1673-7717(2026)03-0120-13

Exploration of Protective Mechanism of Jiawei Zexie Decoction(加味泽泻汤) on Vascular Endothelium in High－Fat Diet－Fed Rats Based on PI3K/AKT/NF－κB Pathway

HE Yuwei[1],LIU Di[1],GUAN Shujun[1],GONG Ming[2],WU Wenlong[1],LI Ting[1],ZHANG Yan[3],ZHAO Xin[2]
(1.Liaoning University of Traditional Chinese Medicine,Shenyang 110847,Liaoning,China;
2.The Second Affiliated Hospital of Dalian Medical University,Dalian 116023,Liaoning ,China;
3.Affiliated Hospital,Liaoning University of Traditional Chinese Medicine,Shenyang 110032,Liaoning,China)

Abstract:*Objective* To explore the protective effect and underlying mechanisms of Jiawei Zexie Decoction(加味泽泻汤,JWZXD) on endothelial injury in hyperlipidemia through the phosphatidylinositol－3－kinase/protein kinase B/nuclear factor－κB(PI3K/AKT/NF－κB) pathway. *Methods* Thirty 4－week－old male SD rats were randomly divided into a normal group(n=6) and a modeling group(n=24). The modeling group was fed a high－fat diet for 20 weeks to establish a hyperlipidemia model. The 24 successfully modeled rats were then randomly divided into four groups: the model group,the JWZXD standard dose group,the JWZXD high－dose group,and the atorvastatin calcium group. After 4 weeks of drug intervention,the body weight,four

基金项目:国家自然科学基金面上项目(82370438);大连医科大学交叉科研合作课题组项目(JCHZ2023014)
作者简介:赫雨薇(1991－),女(满族),辽宁沈阳人,主治中医师,博士,研究方向:冠心病中西医药物联合介入治疗。
通讯作者:赵昕(1970－),女,浙江绍兴人,主任医师,博士研究生导师,博士后,研究方向:冠心病中西医药物联合介入治疗。E-mail:zx81830@163.com。
张艳(1960－),女,辽宁丹东人,主任医师、教授,博士研究生导师,博士,研究方向:中西医结合心血管。E-mail:yanzhang1016@126.com。

blood lipid parameters[total cholesterol(TC), triglyceride(TG), high-density lipoprotein cholesterol(HDL-C), low-density lipoprotein cholesterol(LDL-C)] and endothelial function-related indicators[endothelin-1(ET-1), nitric oxide(NO)] were detected, and the aortic tissue was stained with hematoxylin and eosin(HE) to evaluate the therapeutic effect of JWZXD on endothelial injury in hyperlipidemia. Subsequently, the network pharmacology analysis was conducted to further explore the pharmacological mechanisms at play. The active components and targets of JWZXD were predicted using the TCMSP, Swiss Target Prediction, HERB, ETCM and BATMAN databases. The targets related to hyperlipidemia and endothelial dysfunction were retrieved from the GeneCards, OMIM, DisGeNET and TTD databases. Venn diagrams, protein-protein interaction(PPI) networks and enrichment analysis were employed to identify mechanism pathways. Real-time fluorescent quantitative PCR(RT-qPCR) was used to detect the mRNA expressions of PI3K, AKT1, NF-κB, IL-6 and TNF in each group and Western blot analysis was conducted to measure the expression levels of endothelial injury pathway-related proteins p-PI3K, PI3K, p-AKT, AKT and NF-κB. *Results* Compared with the normal group, the model group showed increased levels of TC, TG, LDL-C and ET-1 ($P<0.01$), and decreased levels of HDL-C and NO ($P<0.05$, $P<0.01$). Network pharmacology analysis identified 29 active ingredients in JWZXD, including 24-acetyl alismol A, kaempferol, alismol A, alismol B, alismol C and atractylenolide I. After PPI network and topological analysis, 62 core targets such as IL-6, AKT1, TNF, IL-1B and STAT3 were identified. Enrichment analysis using the DAVID platform mainly identified 156 signaling pathways, including the PI3K-AKT signaling pathway, lipids and atherosclerosis, HIF-1 signaling pathway, TNF signaling pathway and EGFR tyrosine kinase inhibitor resistance. Animal experiment results showed that compared with the model group, JWZXD down-regulated the mRNA expression levels of PI3K, AKT1, NF-κB, IL-6, TNF, etc., and up-regulated the protein expression levels of endothelial p-PI3K, PI3K, p-AKT and AKT ($P<0.05$, $P<0.01$) while down-regulated the protein expression of NF-κB ($P<0.05$, $P<0.01$). *Conclusion* JWZXD has a good effect on lowering blood lipids, inhibiting the expression of inflammatory factors and protecting vascular endothelial function. Its mechanism may be achieved through the activation of the PI3K/AKT/NF-κB signaling pathway.

Keywords: Jiawei Zexie Decoction(加味泽泻汤); hyperlipidemia; endothelial dysfunction; network pharmacology; PI3K/AKT/NFκB pathway

心血管疾病是人类健康的重大威胁[1]，高脂血症(hyperlipidemia，HLP)是导致心血管疾病发生的主要危险因素[2]。其主要特点为总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)和低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)的含量显著升高，高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)的水平显著降低[3]。现代生活中普遍存在的高脂饮食、暴饮暴食和缺乏运动等不健康的生活习惯致使高脂血症患病率及发病率逐年上升[4]。相关研究表明，高脂血症、高血糖和高血压等刺激引起的扰动可诱发内皮功能障碍[5]。血管内皮细胞位于血液和血管组织之间，具有屏障、通透、迁移、增殖修复和内分泌等多种功能，能够维持心血管系统生理过程的稳态，在心血管疾病发生发展过程中具有至关重要的作用。然而，它们很容易受到各种物理、化学和生物因素的破坏。当内皮受到包括高血糖、高脂血症和神经激素失衡在内的有害刺激时，不同的生物通路被激活，导致氧化应激、内皮功能障碍，脂肪因子、细胞因子、内皮素-1和成纤维细胞生长因子分泌增加，一氧化氮(NO)生成减少，内皮血管舒张剂和血管收缩剂之间的稳态失衡，最终NO完整性丧失[6-7]，导致心血管疾病的发生[8]。既往研究表明在检测损伤或病原体相关的分子模式时，炎症细胞因子如白细胞介素(IL)-6和肿瘤坏死因子(TNF)-α的过量产生也促进了内皮功能障碍的发生[9-10]。值得注意的是，脂肪中的饱和脂肪酸可通过促进炎症、氧化应激和内皮细胞中一氧化氮生成受损参与到动脉粥样硬化的发展中来[11]。可见高脂可诱发内皮功能障碍，且与炎症级联反应相关。目前，他汀类药物是临床最常用于治疗高脂血症的降脂药物，是对抗心脑血管事件的明智策略[12]。然而服用西药周期长，依从性差，且对于内皮功能障碍单纯降低血脂并不能完全控制疾病进展。因此，中医药其优势初显，因其具有“观其脉症，随证治之”的辨证论治思想，从整体观念角度去遣方用药，当前，中医药在防治HLP，改善血管内皮损伤方面疗效显著[13]。

中医学对“高脂血症”未提出命名记载，《黄帝内经》中有“膏粱”“油脂”“膏脂”等关于脂的阐述，强调其因过食肥甘厚味，或肝脾肾脏腑功能失调，则膏脂不归正化，聚成痰浊而形成的病症[14]。泽泻汤由泽泻、白术两味中药组成，《金匮要略》有言：“心下有支饮，其人苦冒眩，泽泻汤主之。”泽泻乃《辅行诀》所载“二十五味药精”之中的“火中土”，甘咸兼具，润肾泻肾，治疗水肿胀满及小便不利；而白术则为《辅行诀》所载“二十五味药精”之中的“水中土”，苦甘兼具，甘补脾土，苦燥脾湿，甘泻肾水，苦补肾水，补泻兼施，脾肾并治，利水除饮，崇土制水之功益彰。两药配伍使用，甘味保留，苦咸化酸，酸甘治肝，利水定眩，可用治饮停心下、头晕目眩、胸中痞闷和咳逆浮肿等症[15]。加味泽泻汤(Jiawei Zexie Decoction，JWZXD)是在对药“泽泻-白术”基础上，加石菖蒲、泽兰两味药，近来发现《金匮要略》泽泻汤在对药“泽泻-白术”基础上加石菖蒲和泽兰二味药后健脾化浊祛痰的疗效显著相关[16]。现代药理研究证实加味泽泻汤有降压、降脂、抗动脉粥样硬化、抗氧化、抗炎、调节免疫及抗癌等作用。

近年来，网络药理学以多成分、多靶点、多通路角度为新视角，采用与系统生物学、生物信息学多领域相结合的方法，广泛作用于中医药研究领域，系统阐明了中药方剂治疗复杂疾病的潜在分子机制[17]，相关研究显示加味泽泻汤治疗高脂血症内皮功能障碍的潜在靶点和分子机制尚在商榷。故本研究旨在以网络药理学的方式，利用体内实验的验证，研究加味泽泻汤治疗高脂血症内皮功能障碍关键靶点，为更进一步的临床应用

提供理论支撑和治疗借鉴。本文通过以下方法步骤进行阐述，详见图 1。

1 实验材料

1.1 实验动物

SD 雄性大鼠 30 只，4 周大小，体质量约（170 ~ 180 g），购于中国南京模式动物中心，饲养于北部战区总医院基础医学实验室，实验前适应性喂养大鼠 1 周，自由进食及饮水，饲养条件为温度 20 ~ 25 ℃，相对湿度 50% ±5%，遵循 12 h 循环明/暗光线规律交替饲养。每 2 ~ 3 d 更换一次垫料以保持清洁。所有动物实验操作均按照动物伦理委员会相关规定执行，编号（AEE2413）。

1.2 实验药材、试剂与仪器

加味泽泻汤的泽泻、白术、石菖蒲、泽兰四味药材的饮片均购买于辽宁中医药大学附属医院。煎煮方法：煎煮方法：先将四味药材用纯水浸泡 1 h 左右，武火煮至沸腾，再转为文火煎煮 20 min，将煮好的药物过滤网，并将 3 次煎煮好的滤液混合到一起，浓缩后冷却，4 ℃冰箱保存；阿托伐他汀钙片（10 mg × 14 片 × 2 板 福建东瑞制药有限公司 批准文号：国药准字 H20193043）进行人鼠换算后按临床等效剂量以给药。

试剂：TC 检测试剂盒、TG 检测试剂盒、HDL - C 检测试剂盒、LDL - C 检测试剂盒（南京建成生物工程研究所，货号分别为 A111 - 1 - 1、A110 - 1 - 1、A112 - 1 - 1、A113 - 1 - 1）；白细胞介素（interleukin，IL - 6）定量检测 Elisa 试剂盒、肿瘤坏死因子（tumor necrosis factor，TNF）- α 定量检测 Elisa 试剂盒（武汉博士德生物工程有限公司，货号为 EK0412、EK0526）；大鼠内皮素 1（ET - 1）ELISA 检测试剂盒（江莱生物，JL10931 - 96T）；实时聚合酶链反应（RT - PCR）试剂盒（日本 Takara 公司）；逆转录试剂盒（长沙艾科瑞生物工程有限公司）。抗 p65 NF - κB、抗体 PI3K、磷酸化 PI3K；AKT、磷酸化 AKT（phosphorylated AKT，p - AKT）、GAPDH（美国 Cell Signaling Technology 公司，货号分别为：8242、4249、9272、4060、2118）；实时聚合酶链反应（RT - PCR）试剂盒（购自日本 Takara 公司）；逆转录试剂盒（中国长沙艾科瑞生物工程有限公司）。仪器：KZ - Ⅱ高速组织研磨仪（武汉赛维尔生物科技有限公司）；低温高速离心机（Eppendorf，德国）；台式离心机（Eppendorf，德国）；实时定量 PCR 仪（Bio - rad 公司，美国）；酶标仪（Bio - rad 公司，美国）。

2 实验方法

2.1 高脂血症大鼠造模方式

将 30 只大鼠适应性喂养 1 周后，按照随机数字表法随机分为空白组及造模组，空白组 6 只予普通饲料喂养，造模组 24 只大鼠予高脂饲料（western diet）喂养，共计喂养 20 周后，通过断尾法采集血液，分离血清，以 3000 r/min 离心 15 min，经血脂四项总胆固醇（TC）、总甘油三酯（TG）、低密度脂蛋白胆固醇（LDL - C）、高密度脂蛋白胆固醇（HDL - C）检测 TC、TG、LDL - C 数值升高，提示造模成功。

2.2 动物分组及给药

将 24 只造模成功大鼠按照随机数字表法随机分成 4 组，每组 6 只，包括模型组（Model）、加味泽泻汤正常剂量组（M - JWZXD）、加味泽泻汤高剂量组（H - JWZXD）和西药阿托伐他汀钙片组（Atorvastatin）。随后进行为期 4 周的干预措施，灌胃期间所有大鼠饮水及饮食同前。通过灌胃方式进行给药，每次灌胃体积 2 mL，每日两次。其中正常组与模型组灌胃等剂量生理盐水，M - JWZXD 组和 H - JWZXD 组给予浓度为 6.3 g/（kg · d）和 12.6 g/（kg · d）的汤药进行灌胃，Atorvastatin 组予 5 mg/（kg · d）混悬液灌胃。灌胃剂量是参考临床患者（体质量 70 kg）的日剂量，并基于体表面积进行转换得出的，即大鼠剂量 = X（人临床剂量）mg/kg × 70 kg × 0.018/0.2 kg。

2.3 标本采集

给药 4 周后，禁食不禁水 12 h，于最后一次灌胃后 2 h 进行血液及组织样本的采集。腹腔注射戊巴比妥钠（50 mg/kg）麻醉大鼠，待大鼠完全麻醉后，碘伏消毒，用手术剪快速打开大鼠腹腔，寻找腹主动脉，腹主动脉采血后，处死大鼠，用手术剪迅速开胸留取大鼠主动脉组织。将促凝管中血液于离心机 3000 r/min 离心 15 min 后留取血清，采用酶标法测血脂四项（TC、TG、HDL - C、LDL - C）检查血脂含量变化，酶联免疫吸附测定（ELISA 法）测定 IL - 6、TNF - α 观察血清炎症因子变化，ELISA 法测定 ET - 1、NO 评估内皮损伤情况，将部分主动脉组织固定于 4% 多聚甲醛中留作后期石蜡包埋，用于 HE 染色以观察主动脉内膜变化，另一部分主动脉组织冻存于 - 80 ℃冰箱，用于相关 mRNA 及蛋白的检测，以探寻其共表达机制。

2.4 各组大鼠体质量及血脂四项变化情况

实验动物每周称体质量 1 次，将开始给药后每周体质量记录并且评估 JWZXD 对体质量的影响。根据血脂四项试剂盒说明书（购自中国南京建成生物工程研究所）采用生化法测定大鼠血清 TC、TG、HDL - C、LDL - C 的动态变化；评估 JWZXD 对血脂四项变化影响。

2.5 主动脉组织 HE 染色病理变化观察

将 4% 多聚甲醛固定好的主动脉组织进行石蜡包埋、切片、HE 染色后，光学显微镜下观察主动脉组织的结构变化（×200、×400），进行主动脉组织病理学形态观察。

2.6 血清炎症因子 IL6、TNF - α 及 ET - 1、NO 水平检测

为了评估内皮损伤过程中炎症因子水平及内皮损伤的改变，将冻存于 - 80 ℃的大鼠血清取出，分别将 IL - 6、TNF - α、ET - 1、NO ELISA 试剂盒平衡至室温后取出反应板，根据试剂盒说明书，先将标准品按梯度稀释，在反应板孔中先后梯度标准品稀释液和样品稀释液，根据说明书过程操作，酶标仪上波长设定为 450 nm，根据各孔的 OD 值绘制标准曲线，根据标准曲线的计算公式分别得出血清中 IL6、TNF - α、ET - 1、NO 样品浓度。

2.7 网络药理学分析

2.7.1 JWZXD 活性成分、靶点预测及网络构建 在 TCMSP（http://tcmsp-e.com/tcmsp.php）、Swiss Target Prediction（https://www.swisstargetprediction.ch/）、HERB 数据库（http://herb.ac.cn/）、ETCM（https://www.tcmip.cn/ETCM/index.php/Home/）和 BATMAN 数据库（http://bionet.ncpsb.org/batmantcm/）等 5 个公共数据库中，获取泽泻、白术、石菖蒲、泽兰四味草药活性成分及其靶点。在筛选 TCMSP 数据库时，根据口服生物利用度（OB）≥30%，类药性（DL）≥0.18，进一步确定有效活性成分，PubChem 数据库查询的 Canonical SMILES 提交到 SwissTargetPrediction 数据库预测靶点信息，利用 UniProt 数据库（https://www.uniprot.org）对相关靶基因进行标注，使用 Cytoscape3.7.2 软件绘制网络图以展示其“药物—成分—靶

点”关系。见插页Ⅺ图1。

2.7.2 高脂血症及内皮功能障碍疾病靶点获取 以“hyperlipidemia”和“Endothelial Dysfunction”为关键词,搜索 Genecards(https://www.genecards.org/)、GEO(https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/)、OMIM(http://omim.org/)、TTD(http://db.idrblab.net/ttd/)和 DisGeNET(https://www.disgenet.org/)等数据库获取靶标。在 Genecards 数据库检索时,关联性越高,越能紧密地将靶点和疾病联系在一起。如果检索的靶点过多,可通过计算中位数的方法筛选潜在靶点。在 GEO 数据库中检索疾病相关基因表达谱,将“Entry type”设置为“Series”,将“Organism”设置为“Homo sapiens”查找符合条件的基因芯片数据集,并下载平台文件,利用 R 包将 log2|(FC)|>0.5 和 adj.P.Val 值<0.05 为标准筛选差异基因,将 5 个数据库基因汇总后得到高脂血症与内皮功能障碍总靶点。

2.7.3 PPI 网络构建与拓扑分析 为了进一步确定核心调控靶点,将泽泻、白术、石菖蒲、泽兰 4 味中药成分靶点与疾病相关的靶蛋白通过微生信在线平台(http://www.bioinformatics.com.cn)绘制成韦恩图,并对交集靶点进行可视化。而后将交集靶点导入 STRING 网站(https://stringdb.org/)进行 PPI 网络的构建,借助 Cytoscape 3.7.2 软件及其 CytoNCA 插件对 PPI 网络进行拓扑分析,选取度(Degree)、中介中心度(Betweenness)和接近中心度(Closeness)都大于中位数的靶点为高脂血症内皮功能障碍的核心靶点。

2.7.4 生物信息学分析 通过 DAVID(https://david.ncifcrf.gov/)数据库输入核心靶点,进行 GO 和 KEGG 富集分析,将结果按照 P 值从小到大排序,进行 GO 分析,在 BP、CC、MF 三个类别中筛选排名前 10 位的条目,KEGG 分析排名前 20 位的条目通过微生信在线平台绘图实现可视化展示。

2.8 RT-qPCR 法测定主动脉组织 PI3K、AKT、NF-κB、IL6、TNF mRNA 表达

各组取部分主动脉组织,按照反转录试剂盒(TaKaRa,日本)将其转录成 cDNA。采用 SYBR Green 进行实时荧光定量 PCR,计算目标基因的相对 mRNA 表达水平。实验中使用的所有引物均由上海生工生物工程有限公司合成并购买。同时,以基因 18 s 作为内参基因,上游引物 18s-F:TTGACGGAAGGGCACCACCAG,下游引物 18s-R:GCACCACCACCCACGGAATCG。经 PCR 仪器目的基因的扩增,PCR 扩增:95 ℃预变性 30 s,变性循环 40 次(95 ℃,5 s,60 ℃,30 s),65 ℃退火/延伸 5 s。绘制溶解曲线,计算 PI3K、AKT、NF-κB、IL-6、TNF 的 mRNA 水平,并将数据归一至内参 18smRNA 标准。运用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法进行数据分析。引物序列及产物长度见表 1。

2.9 蛋白免疫印迹法(Western Blot)测定主动脉组织 PI3K、p-PI3K、AKT、p-AKT、NF-κB p65 蛋白表达

为了明确 JWZXD 对 HLP 主动脉内皮损伤分子机制的影响,探寻相关蛋白表达情况,我们进行了蛋白质免疫印迹实验检测。称取适量主动脉组织,通过配置不同浓度梯度的 BCA 标准品,将蛋白样品浓度统一化;通过制胶、加样,跑电泳等步骤后,将聚偏二氟乙烯膜(PVDF,Merck,Millipore)切成 5.5 cm×8.5 cm 大小,在甲醇中浸泡 5~10 min,使其活化,按“三明治夹心法”安装凝胶夹(海绵垫上放置三层滤纸,然后依次放 PVDF 膜,凝胶,三层滤纸,海绵垫)。转膜 2 h 后将 PVDF 膜置于封闭液(5% 的脱脂奶粉加 1×TBST)中,室温摇床封闭 2 h。之后将膜放入稀释后的含有抗 p-PI3K(1∶1000)、PI3K(1∶1000),AKT(1∶1000),p-AKT(1∶1000),NF-κB p65(1∶1000)一抗中,4 ℃孵育过夜。第 2 天,将孵育过夜的 PVDF 膜取出,清洗,配二抗,室温孵育 1 h,TBST 洗 3 次,间隔 10 min。最后,将 PVDF 膜置于曝光机中显影,Image J 软件分析条带灰度值。本研究均以 GAPDH 作为蛋白定量的内参计算相对定量(靶蛋白相对表达量=靶蛋白定量值/GAPDH 定量值×100%)。

表1 PCR 引物序列及产物长度

目的基因		基因序列(5to3')	产物长度(bp 值)
PI3K	F	CTGGTTCTTGCGAAGTGAGATAGC	120
	R	ACCTGCTGCGTGAAGTCCTG	
AKT	F	GGCAGGAGGAGGAGACGATGG	109
	R	TTCATGGTCACACGGTGCTTGG	
NF-κB	F	TGTGGTGGAGGACTTGCTGAG	135
	R	GCTGCCTTGCTGTTCTTGAGTAG	
IL6	F	AGCCACTCACCTCTTCAGAACG	104
	R	TGCCTCTTTGCTGCTTTCACAC	
TNF-α	F	ATGGGCTCCCTCTCATCAGTTCC	114
	R	GCTCCTCCGCTTGGTGGTTTG	

2.10 数据统计分析

采用 SPSS 25.0 统计软件进行分析。实验数据符合正态分布条件,计量资料采用均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,两组间比较采用 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析(One-Way ANOVA)。不满足正态分布,使用非参数检验,以 $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 JWZXD 对各组大鼠体质量的影响

结果表明,JWZXD 干预前各组大鼠体质量差异无统计学意义,Normal 组大鼠体质量变化不明显,Model 组体质量明显增加,与 Model 组相比,M-JWZXD 组、H-JWZXD 组及 Atorvastatin 组治疗后体质量均显著下降。见插页Ⅺ图2。

3.2 JWZXD 对各组大鼠血脂四项浓度影响

如表 2 所示,与正常组相比,造模组 TC、TG、LDL-C 水平明显升高,HDL-C 组水平明显降低,提示造模成功。如表 3 所示。与 Normal 组相比,Model 组大鼠的血清中的 TC、TG、LDL-C 显著增高($P<0.01$),HDL-C 显著降低($P<0.01$),然而,与 Model 组相比,JWZXD 给药后血清中的 TC、TG、LDL-C 显著降低($P<0.01$),HDL-C 显著增高($P<0.01$),差异有显著统计学意义。

表2 造模成功血脂 TC、TG、HDL-C、LDL-C 的情况($\bar{x}\pm s$)

单位:mmoL·L^{-1}

组别	n	TC	TG	HDL-C	LDL-C
正常组	6	2.28±0.42	1.13±0.17	1.16±0.20	0.99±0.25
造模组	24	4.53±0.54	2.18±0.64	0.69±0.09	2.44±0.33

3.3 各组大鼠主动脉组织病理改变

见插页Ⅺ图3。Normal 组大鼠的主动脉内皮结构较完整,内膜可见较为平整光滑,可见中膜弹性纤维和平滑肌细胞排列得较为规则;与 Normal 组相比,Model 组可见广泛可见内皮细胞脱落,内弹性膜拉伸、变平,中膜平滑肌细胞、弹性纤维及弹

性膜排列不规则，可见较多水样变性的平滑肌细胞；与 Model 组相比，M－JWZXD 组及 H－JWZXD 及 Atorvastatin 组中各组主动脉内膜边缘较完整，少量内皮细胞脱落，可见中膜弹性纤维和平滑肌细胞不规则情况均有不同程度的恢复。

表 3 JWZXD 对血清 TC、TG、HDL－C、LDL－C 浓度的影响（$\bar{x} \pm s$）

单位：mmoL·L^{-1}

组别	n	TC	TG	HDL－C	LDL－C
正常组	6	2.16±0.31	1.24±0.20	1.24±0.11	0.93±0.36
模型组	6	4.74±1.16[2)]	2.52±0.60[2)]	0.57±0.20[2)]	2.66±0.46[2)]
加味泽泻汤正常剂量组	6	3.32±0.22[4)]	2.18±0.27	0.70±0.15	1.91±0.25[4)]
加味泽泻汤高剂量组	6	2.98±0.39[4)]	1.86±0.24[4)]	0.83±0.16[3)]	1.54±0.22[4)]
阿托伐他汀钙组	6	2.24±0.29[4)]	1.60±0.22[4)]	0.96±0.10[4)]	0.98±0.20[4)]

注：1）与空白组比较，$P<0.05$；2）与空白组比较，$P<0.01$；3）与模型组比较，$P<0.05$；4）与模型组比较，$P<0.01$。

3.4 各组大鼠 IL6、TNF－α 炎症因子及 ET－1、NO 表达水平的影响

如表 4 所示，与 Normal 组相比，Model 组大鼠血清中 IL－6 和 TNF－α 浓度显著升高（$P<0.01$）；与 Model 组比较，M－JWZXD 组、H－JWZXD 组大鼠血清中 IL－6 和 TNF－α 水平均有不同程度降低（$P<0.01$）。

表 4 JWZXD 对各组大鼠 IL－6、TNF－α 炎症因子及 ET－1、NO 表达水平的影响（$\bar{x} \pm s$）

组别	n	IL－6/（pg/mL）	TNF－α/（pg/mL）	ET－1/（pg/mL）	NO/（μmol/L）
正常组	6	111.94±6.81	136.95±6.81	1.33±0.08	53.58±3.12
模型组	6	246.92±29.86[2)]	234.19±28.26[2)]	2.18±0.17[2)]	29.95±1.74[2)]
加味泽泻汤正常剂量组	6	176.94±16.32[4)]	178.33±11.37[4)]	1.88±0.07[4)]	42.87±3.82[4)]
加味泽泻汤高剂量组	6	142.18±15.33[4)]	160.35±13.85[4)]	1.66±0.06[4)]	47.18±2.17[4)]
阿托伐他汀钙组	6	133.98±10.61[4)]	145.65±13.43[4)]	1.56±0.05[4)]	45.01±3.93[4)]

注：1）与空白组比较，$P<0.05$；2）与空白组比较，$P<0.01$；3）与模型组比较，$P<0.05$；4）与模型组比较，$P<0.01$。

3.5 网络药理学分析结果

3.5.1 JWZXD 活性成分获取及网络构建 从 TCMSP、Swiss Target Prediction、HERB 数据库、ETCM 和 BATMAN 数据库等 5 个公共数据库中，分别输入“泽泻”“白术”“石菖蒲”“泽兰”，筛选 4 味中药活性成分及其对应靶点，另外根据文献[18－21]将泽泻醇 A、24－乙酰泽泻醇 A、白术内酯Ⅰ、白术内酯Ⅱ、白术内酯Ⅲ、双白术内酯、苍术酮等重要成分纳入，最终获得泽泻活性成分 11 个（靶点 436 个）、白术活性成分 12 个（靶点 429 个），石菖蒲活性成分 4 个（靶点 354 个），泽兰活性成分 2 个（靶点 193 个），共得到中药成分靶点 717 个，导入 Cytoscape 软件，根据 Degree 大小对泽泻、白术、石菖蒲、泽兰的成分进行渲染，具体活性成分见表 5，得出关键活性成分为 24－乙酰泽泻醇 A、山柰酚、泽泻醇 A、泽泻醇 B、泽泻醇 C、白术内酯Ⅰ，并绘制“中药复方—活性成分—靶点”网络图，见插页ⅪⅬⅢ图 4、图 5A，该网络共有 751 个节点，涉及 2832 条边，其中 JWZXD 复方以红色箭头节点展示，泽泻、白术、石菖蒲、泽兰 4 味中药以亮蓝色三角形节点展示。

3.5.2 高脂血症及内皮功能障碍疾病相关靶点 以“hyperlipidemia”和“Endothelial Dysfunction”为关键词，通过 Genecards、GEO、OMIM、TTD 和 DisGeNET 等数据库进行检索收集疾病相关靶标。GEO 数据库基因芯片数据集高脂血症（GSE25311）和内皮功能障碍芯片数据（GSE48006），将 5 个数据库的高脂血症及内皮功能障碍相关疾病靶点绘制疾病靶点韦恩图，展示如插页ⅪⅬⅢ图 5B，其中 GeneCard 数据库（3067 个靶点）、GEO 数据库（1717 个靶点）、OMIM（278 个靶点）、TTD（11 个靶点）、DisGeNET（27 个靶点），将 5 个疾病数据库相关靶点取并集去重后共得到 3328 个高脂血症总靶点，2279 个内皮功能障碍总靶点。

3.5.3 中药成分—疾病靶点 PPI 网络构建及拓扑分析 将 717 个中药成分靶点与 3328 个高脂血症及 2279 个内皮功能障碍相关的靶蛋白通过微生信在线平台绘制韦恩图，得到 164 个交集基因靶点，并对其进行可视化，如插页ⅪⅬⅢ图 6 所示。通过 STRING 数据库和 cytoscape 软件对 164 个交集靶点构建 PPI 网络图并进行拓扑分析，经除去无关联靶点后得到网络共 163 个节点，3583 条边，经 CytoNCA 插件及筛选中位数分析 degree＞40、Betweenness＞43.765 614、Closeness＞0.564 459 9 后共获得 62 个关键靶点，如插页ⅪⅬⅢ图 6 所示为拓扑分析过程的可视化，表 6 为 62 个核心靶点的详细信息，筛选排名前 5 的关键靶点分别为IL－6、AKT1、TNF、IL－1B、STAT3，推测这些靶点可能

表 5 泽泻、白术、石菖蒲、泽兰活性成分基本信息

药物编号	数据库编号	成分名称	OB/（%）	DL	PubChem CID	靶点数	来源
ZX11	MOL000851	24－乙酰泽泻醇 A	24.21	0.80	76 336 194	190	泽泻
SCP4	MOL000422	山柰酚	41.88	0.24	5 280 863	174	石菖蒲
ZX10	MOL000828	泽泻醇 A	18.28	0.81	15 558 616	170	泽泻
ZX2	MOL000830	泽泻醇 B	34.47	0.82	162 952 178	149	泽泻
ZX6	MOL000854	泽泻醇 C	32.7	0.82	101 306 923	126	泽泻
BZ8	MOL000043	白术内酯Ⅰ	37.37	0.15	5 321 018	120	白术
ZX4	MOL000832	23－乙酰泽泻醇 B	32.52	0.82	163 065 497	118	泽泻
SCP1	MOL003542	8－异戊烯基山柰酚	38.04	0.39	5 318 624	118	石菖蒲
BZ3	MOL000022	14－乙酰基－12－千里光酰基－8－顺式折术三醇	63.37	0.30	132 941 086	107	白术
ZX8	MOL002464	单亚油酸甘油酯	37.18	0.30	6 436 630	105	泽泻
BZ2	MOL000021	14－乙酰基各里光酰基－8－反式白术三醇	60.31	0.31	163 072 314	105	白术
BZ12	MOL000062	双白术内酯	17.45	0.81	10 813 930	103	白术
ZX5	MOL000849	16β－甲氧基泽泻醇 B 乙酸酯	32.43	0.77	162 953 612	100	泽泻
ZL1	MOL000296	熊果酸	36.91	0.75	73 299	100	泽兰
ZX7	MOL000856	23－乙酰泽泻醇 C	33.06	0.83	14 036 813	98	泽泻

续表 5 泽泻、白术、石菖蒲、泽兰活性成分基本信息

药物编号	数据库编号	成分名称	OB/(%)	DL	PubChem CID	靶点数	来源
BZ1	MOL000020	12-千里光酰基-8-反式白术三醇	62.40	0.22	162 988 381	94	白术
ZX3	MOL000831	泽泻醇 B 单醋酸盐	35.58	0.81	163 083 573	93	泽泻
ZL2	MOL000358	β-谷甾醇	36.91	0.75	222 284	93	泽兰
ZX9	MOL000862	[(1S,3R)-1-[(2R)-3,3-二甲基环氧乙烷-2-基]-3-[(5R,8S,9S,10S,11S,14R)-11-羟基-4,4,8,10,14-五甲基-3-氧代-1,2,5,6,7,9,11,12,15,16-十氢环戊二烯并[a]菲-17-基]丁基]乙酸酯	35.58	0.81	14 036 811	90	泽泻
ZX1	MOL000359	谷甾醇	36.91	0.75	12 303 645	60	泽泻
BZ4	MOL000028	α-香树脂醇	39.51	0.76	163 022 464	59	白术
BZ9	MOL000044	白术内酯Ⅱ	47.50	0.15	14 448 070	58	白术
BZ10	MOL000045	白术内酯Ⅲ	68.11	0.17	155 948	57	白术
BZ5	MOL000033	(3S,8S,9S,10R,13R,14S,17R)-10,13-二甲基-17-[(2R,5S)-5-丙烷-2-yloctan-2-yl]-2,3,4,7,8,9,11,12,14,15,16,17-十二水-1H-环戊二烯[a]菲酚-3-ol	36.23	0.78	15 976 101	51	白术
BZ7	MOL000072	8β-乙氧基苍术内酯-Ⅲ	35.95	0.21	14 448 075	50	白术
SCP2	MOL003576	(1R,3aS,4R,6aS)-1,4-双(3,4-二甲氧基苯基)-3,3a,4,6,6a-六氢呋喃[4,3-c]呋喃	52.35	0.62	325 601	34	石菖蒲
BZ11	MOL000046	苍术酮	41.10	0.13	12 299 876	33	白术
SCP3	MOL003578	环阿屯醇	38.69	0.78	92 110	28	石菖蒲
BZ6	MOL000049	3β-乙酰氧基苍术酮	54.07	0.22	163 082 914	27	白术

表 6 62 个核心靶点拓扑分析结果

序号	名称	Degree	Betweenness	Closeness	序号	名称	Degree	Betweenness	Closeness
1	白细胞介素 6(IL-6)	127	1 493.920 8	0.822 335 00	33	基质金属蛋白酶 2(MMP2)	69	122.403 04	0.632 812 50
2	蛋白激酶 B(PKB)α 亚基(AKT1)	127	1 231.345 2	0.818 181 80	34	磷脂酰肌醇-3-激酶调节亚基 1(PIK3R1)	67	75.792 46	0.625 482 60
3	肿瘤坏死因子(TNF)	123	1 342.836 2	0.805 970 13	35	血管内皮生长因子受体 2(KDR)	66	82.007 41	0.623 076 90
4	白细胞介素 1β(IL1B)	109	788.021 5	0.753 488 36	36	E1A 结合蛋白 p300(EP300)	66	181.320 16	0.625 482 60
5	信号转导及转录激活因子 3(STAT3)	108	433.456 42	0.746 543 77	37	淀粉样前体蛋白(APP)	66	323.511 54	0.627 907 00
6	酪氨酸激酶 Src(SRC)	107	739.421 75	0.743 119 24	38	磷脂酰肌醇-3-激酶催化亚基 α(PIK3CA)	65	55.450 153	0.620 689 63
7	B 细胞淋巴瘤-2 基因(BCL2)	103	397.562 93	0.729 729 70	39	过氧化物酶体增殖物激活受体 α(PPARA)	65	189.509 55	0.623 076 90
8	过氧化物酶体增殖物激活受体 γ(PPARG)	103	734.447 7	0.729 729 70	40	蛋白酪氨酸磷酸酶受体型 C(PTPRC)	64	95.448 875	0.618 320 60
9	表皮生长因子受体(EGFR)	100	816.301 2	0.723 214 27	41	白细胞介素 4(IL4)	64	76.794 01	0.620 689 63
10	雌激素受体 1(ESR1)	100	809.985 35	0.720 000 00	42	血管细胞黏附分子 1(VCAM1)	62	140.742 11	0.618 320 60
11	半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 3(CASP3)	99	280.642 64	0.716 814 16	43	核转录因子-κB p65(RELA)	61	91.273 38	0.611 320 73
12	缺氧诱导因子 1α 亚基(HIF1A)	98	433.459 47	0.713 656 37	44	多聚 ADP 核糖聚合酶 1(PARP1)	60	56.799 3	0.606 741 55
13	核因子 κB p50 亚基(NFKB1)	97	267.578 34	0.710 526 30	45	血小板源生长因子受体 β(PDGFRB)	60	51.011 08	0.609 022 56
14	哺乳类雷帕霉素靶蛋白(MTOR)	93	274.754 94	0.698 275 86	46	血红素加氧酶 1(HMOX1)	58	97.047 62	0.606 741 55
15	热休克蛋白 90α 类 1(HSP90AA1)	92	513.695	0.698 275 86	47	葡萄糖转运蛋白 4(SLC2A4)	55	201.013 06	0.597 785 95
16	转录因子 Jun(JUN)	92	192.526 15	0.695 278 94	48	孕激素受体(PGR)	55	57.390 175	0.597 785 95
17	丝裂原激活的蛋白激酶 3(MAPK3)	90	365.723 57	0.689 361 70	49	蛋白酪氨酸磷酸酶非受体型 11(PTPN11)	55	77.374 36	0.593 406 60
18	基质金属蛋白酶 9(MMP9)	90	244.713 23	0.689 361 70	50	雄激素受体(AR)	54	87.394 89	0.597 785 95
19	转化生长因子 β1(TGFB1)	90	259.763 73	0.689 361 70	51	酪氨酸激酶 Fyn(FYN)	53	254.165 28	0.593 406 60
20	前列腺素内过氧化物合成酶 2(PTGS2)	84	271.406 74	0.672 199 20	52	CREB 结合蛋白(CREBBP)	52	57.375 507	0.593 406 60
21	人类表皮生长因子受体 2(ERBB2)	81	164.824 51	0.663 934 40	53	内皮素 1(EDN1)	52	120.067 99	0.595 588 20
22	细胞周期蛋白 D1(CCND1)	80	128.287 86	0.658 536 60	54	糖皮质激素受体(NR3C1)	50	51.878 61	0.589 090 90
23	糖原合成酶激酶 3β(GSK3B)	79	166.300 13	0.655 870 44	55	髓过氧化物酶(MPO)	50	117.107 4	0.589 090 90
24	转录因子 Fos(FOS)	78	358.045 07	0.655 870 44	56	血管紧张素原酶(REN)	50	276.024 84	0.589 090 90
25	信号转导及转录激活因子 1(STAT1)	76	114.952 93	0.650 602 40	57	神经营养酪氨酸激酶受体 1(NTRK1)	49	53.301 05	0.584 837 56
26	趋化因子配体 8(CXCL8)	76	184.171 36	0.653 225 80	58	固醇调节元件结合蛋白 1(SREBF1)	48	146.482 64	0.580 645 14
27	Toll 样受体 4(TLR4)	74	141.503 23	0.645 418 35	59	3-羟基-3-甲基戊二酸单酰辅酶 A 还原酶(HMGCR)	47	252.821 06	0.580 645 14
28	载脂蛋白 E(APOE)	73	603.75	0.645 418 35	60	雌激素受体 2(ESR2)	47	76.423 45	0.578 571 44
29	鼠双微体 2(MDM2)	72	197.627 69	0.640 316 20	61	血管内皮生长因子受体 1(FLT1)	46	44.645 184	0.580 645 14
30	胰岛素样生长因子 1 受体(IGF1R)	72	101.926 83	0.637 795 27	62	丙酮酸激酶 M 型(PKM)	43	119.643 79	0.570 422 53
31	Janus 激酶 2(JAK2)	72	121.428 22	0.640 316 20					
32	细胞间黏附分子 1(ICAM1)	70	147.546 3	0.637 795 27					

是 JWZXD 发挥治疗高脂血症、内皮功能障碍作用的核心靶点。

3.5.4 GO 功能注释及 KEGG 通路分析 为了进一步研究 JWZXD 治疗本病的作用机制，我们对 PPI 网络中筛选到的 62 个核心靶基因进行 GO 富集注释和 KEGG 通路分析。总共有 681 个 GO 生物过程和 156 个 KEGG 富集分析结果。将 BP、CC、MF 各选取前 10 项进行富集结果展示，见插页XLⅣ图 7A，可以看出加味泽泻汤药治疗高脂血症的内皮功能障碍的生物过程主要富集在平滑肌细胞增殖的正调控、DNA 模板转录的正调控、细胞凋亡过程的负调控、一氧化氮生物合成过程的正调控、ERK1 和 ERK2 信号通路的正调控等；细胞组分分布于受体复合物、细胞核、核质、膜筏、细胞质；KEGG 富集在 PI3K－AKT 信号通路、脂质与动脉粥样硬化、HIF－1 信号通路、TNF 信号通路等通路，将前 20 条具有代表性的信号通路绘制 KEGG 气泡图如插页XLⅣ图 7B 所示，这些通路可能是 JWZXD 发挥治疗高脂血症内皮功能障碍的关键通路。

3.5.5 各组大鼠主动脉组织 PI3K、AKT1、NF－κB、IL6、TNF mRNA 表达水平的比较 为了进一步阐明 JWZXD 对本病的作用机制，采用 RT－PCR 检测肝脏 PI3K、AKT1、NF－κB、IL－6、TNF－α mRNA 表达。结果示：与 Normal 组比较，Model 组基因表达均显著增高，与 Model 组比较，药物干预组降低 PI3K、AKT1、NF－κB、IL6、TNF－α mRNA 表达，因此，我们推断 JWZXD 参与改善内皮损伤可能通过减轻炎症反应来实现的。如表 7 所示。

表 7 各组大鼠主动脉组织 PI3K、AKT1、NF－κB、IL－6、TNF－α mRNA 表达（$\bar{x} \pm s$） 单位：pg/mL

组别	n	PI3K	AKT1	NF－κB	IL－6	TNF
正常组	6	1.06±0.29	1.07±0.23	1.1±0.52	1.06±0.44	1.03±0.32
模型组	6	2.74±0.29[2)]	2.48±0.75[1)]	4.04±0.51[2)]	6.00±0.54[2)]	6.24±0.75[2)]
加味泽泻汤正常剂量组	6	1.98±0.47	1.70±0.44	2.89±0.92	3.90±0.37[4)]	4.46±1.19
加味泽泻汤高剂量组	6	1.55±0.47[4)]	1.35±0.35[3)]	2.63±0.89[4)]	2.52±0.75[4)]	3.65±0.97[3)]
阿托伐他汀钙组	6	1.25±0.25[4)]	1.17±0.37[3)]	1.28±0.48[4)]	1.92±0.68[4)]	2.89±0.58[4)]

注：1）与空白组比较，$P<0.05$；2）与空白组比较，$P<0.01$；3）与模型组比较，$P<0.05$；4）与模型组比较，$P<0.01$。

3.5.6 各组大鼠主动脉组织 PI3K、AKT、p－AKT、NF－κB 蛋白的表达 如插页XLⅣ图 8 所示，与正常组比较，模型组主动脉 PI3K/p－PI3K、p－AKT/AKT 蛋白表达水平显著下降；NF－κB 炎症信号通路水平显著上升（$P<0.01$），与模型组比较，JWZXD 组主动脉内皮 PI3K、p－AKT/AKT、蛋白表达水平显著上升，NF－κB 炎症信号通路水平明显下降（$P<0.01$）。

4 讨论

高脂血症是一种全球普遍存在的代谢性疾病，相关研究表明饮食中大量的脂肪会加速动脉粥样硬化的发展[22]。其相关机制为高脂血症导致 ROS 过度生成，增加氧化应激和脂质过氧化，导致动脉粥样硬化和血管内皮功能障碍[23]。《黄帝内经》强调“高脂血症”是膏脂代谢失常的疾病，其因过食肥甘厚味，或肝脾肾脏腑功能失调，则膏脂不归正化，聚成痰浊而形成的病症。“痰浊”的形成不仅是发病基础，更是重要的病理产物，贯彻疾病始终。加味泽泻汤的组方配伍暗合“升降”之理，有“健脾化浊”之效，是调和肝脾，调畅气机之妙方。

既往研究表明，泽泻汤具有体内外降脂作用，对小鼠肝脏脂肪堆积和肝损伤具有一定的改善作用，降低小鼠体内血脂水平[24]，研究发现利用 ox－LDL 可抑制血管内皮细胞活性，引起细胞氧化损伤，泽泻作用于血管内皮细胞后可促使细胞培养液中 NOS 水平升高，促进 NO 合成，说明泽泻具有抗氧化损伤作用[25]，也有研究表明，泽泻作用于 H2O2 诱导损伤血管内皮细胞后，可使其上清中超氧化物歧化酶（superoxide dismutase，SOD）水平升高，表明泽泻可能通过上调 SOD 对抗 H2O2 诱导的氧化损伤，对内皮细胞发挥保护作用[26]。此外，白术在抗炎作用方面也表现出独特的优势。其活性成分能够显著降低肿瘤坏死因子－α（TNF－α）、白细胞介素－1β（IL－1β）和诱导型一氧化氮合酶（iNOS）等炎症因子的表达，并通过抑制核因子－κB（NF－κB）信号通路的激活，减轻炎症反应[27]。在免疫调节方面，白术多糖被认为是其主要活性成分之一，能够增强巨噬细胞的吞噬能力，促进淋巴细胞增殖，从而提高机体的免疫功能[28]。在神经保护方面，白术内酯类成分通过抗氧化和抗炎机制，减轻神经细胞的氧化损伤和炎症反应，从而发挥保护作用[29]。石菖蒲为天南星科植物的干燥根茎，虽有小毒，但在中医药中应用历史悠久且广泛[30]。近年来，随着对石菖蒲研究的深入，其多通道、多靶点的全面调节作用逐渐被揭示，使其在心血管疾病、高脂血症和高血压病等慢性代谢性疾病的防治中得到广泛应用[31]。例如，其活性成分能够抑制炎症因子的释放，减轻血管内皮细胞的氧化损伤，从而改善血管功能[32]。泽兰是一种传统中药，具有活血化瘀、增强免疫的功效，泽兰中的活性成分（如黄酮类、酚酸类和萜类化合物）通过多靶点、多途径发挥作用，例如通过抑制炎症介质的释放、清除自由基、调节免疫细胞功能以及抑制肿瘤细胞增殖等机制，展现出广泛的药理作用[33－34]。

本研究通过体内实验采用高脂饲喂 SD 大鼠建立高脂血症内皮功能障碍模型，给予加味泽泻汤进行干预治疗，以证实其抗氧化、抗炎、降血脂、抗动脉粥样硬化作用。研究发现，加味泽泻汤组显著降低 TC、TG、LDL－C 浓度，显著升高 HDL－C 水平。通过主动脉组织 HE 染色可见加味泽泻汤可以保护血管内皮细胞，减轻主动脉组织病理损伤。此外，加味泽泻汤能显著降低大鼠血清中 IL－6、TNF－α、ET－1 水平，升高 NO 水平，显著下调 PI3K、AKT1、NF－κB、IL6、TNF 等 mRNA 表达水平，并使内皮 p－PI3K、PI3K、p－AKT、AKT 蛋白表达水平上调（$P<0.05$，$P<0.01$）表明加味泽泻汤可能通过调节炎症反应来改善高脂血症保护内皮细胞功能，对疾病有良好的防治作用。

为深入探究加味泽泻汤治疗高脂血症保护内皮功能具体分子机制，通过网络药理学分析，我们发现 24－乙酰泽泻醇 A［泽泻醇 A（B，C）单乙酸酯］、山柰酚、泽泻醇 A、泽泻醇 B、泽泻醇 C、白术内酯 I 作为重要活性成分在该网络中起主要作用。泽泻醇 A（B，C）单乙酸酯，亦称泽泻醇 A 24－乙酸酯，是从泽泻中分离出的一种突出且具有生物活性的三萜类化合物，具有抗炎、降脂和降糖等多种生物学活性[35]。大量文献表明，24－乙酰泽泻醇 A 不仅通过增加脂肪酸 β－氧化来预防肝脂肪变性，还能通过刺激完全分化的脂肪细胞中的中性脂肪分解来减少脂质积聚[36－37]。山柰酚（Kaempferol），来源于石菖蒲，是一种黄酮类化合物，是许多药用植物的核心活性成分，研究表明山柰酚对氧化应激、炎症、脂质代谢和抗肿瘤有广泛的药理作用[38]；泽泻醇 A，泽泻的活性成分之一，通过体内外实验证实能够抑制 HepG2 高脂细胞模型的脂质沉积[39]，泽泻醇 B

和泽泻醇 C 均属于泽泻的有效活性成分，研究表明泽泻的活性化合物可与 TNF－α 和 IL－1B 紧密结合，表明泽泻的降脂作用主要与调节炎症细胞因子的释放有关[40]；白术内酯 I 作为中药白术的重要提取物，已有研究表明白术提取物能够减弱脂肪组织中的炎症反应[41]。为深入探究 JWZXD 治疗 HLP 内皮损伤的关键靶点，根据 PPI 网络拓扑分析得到作用于疾病的异病同治关键靶点为 IL－6、AKT1、TNF、IL－1B、STAT3，GO 功能注释与 KEGG 通路富集分析发现，其可能的作用机制与 PI3K－AKT 信号通路、脂质与动脉粥样硬化、HIF－1 信号通路、TNF 信号通路等信号通路相关，并通过体内实验获得了验证，充分证明 JWZXD 可通过降低炎性因子 IL－6、TNFα 的含量，抑制炎症反应，改善血管内皮损伤。表明网络药理学是一个多靶点、多通路、多角度阐明中药方剂治疗疾病的潜在分子机制。

本实验通过高脂饲喂 SD 大鼠 20 周，血浆中 LDL－C 水平升高，这可能是内皮功能障碍导致脂质在血管内膜积累，诱导炎症因子 IL－6 和 TNF－α 的释放[42]，激活 TNF、NF－κB、HIF－1 等信号通路引发一系列炎症反应[43]。与此同时，研究发现炎症细胞因子也会进一步促进内皮功能障碍，使 NO 生物利用度受损[44]，如 CRP、TNF－α 和 IL－6 等炎症因子破坏内皮细胞功能，损害 NO 的产生和释放，NO 是机体内经典的血管内皮分泌的舒张因子，NO 的受损可进一步导致血管舒张功能减弱加剧脂质代谢紊乱。最近由 BAKHSH A 等[45]、ISMAIL BS 等[46]的研究已经建立了炎症标志物 CRP、IL－1B、IL－6 和 TNF－α 水平升高与动脉粥样硬化的严重程度和未来心血管事件的可能性之间的稳定关系，进一步展示炎症反应与脂质代谢障碍的密不可分。研究表明，参与炎症反应的 TNF、HIF－1 等信号通路均与 NF－κB 信号通路存在交互作用[47]。根据研究显示，TNF－α 是调节炎症反应和免疫功能的重要因子，不仅可激活 TNF－α 信号通路诱导氧化应激，增加内皮细胞内 LDL－C 的胞吞作用，在动脉粥样硬化的多个阶段导致炎症反应及代谢紊乱[48]。TNF－α 也可刺激核因子 κB（NF－κB）信号通路，调节脂肪分解和活化[49]，而 NF－κB 又是重要的转录因子，可调控多种与炎症相关的基因。ATTIQ A 等[50]研究发现 NO 可以通过抑制 NF－κB 通路下调许多炎症和黏附分子，其中 eNOS 是血管内皮上产生 NO 的主要来源，AKT1 是内皮细胞 eNOS 活化的经典激酶，它在葡萄糖稳态、蛋白质合成、脂质代谢、细胞增殖和存活中发挥重要的调节作用[51]。SHEN Y T 等[52]发现，激活 PI3K/AKT 信号通路可降低 IL－1β 和 TNF－α 的表达。可以看出核心靶点 IL－6、AKT1、TNF、IL－1B 等不仅在高脂血症内皮功能障碍发病机制及治疗中均发挥了重要作用，而且广泛参与了细胞凋亡、脂质代谢和细胞增殖的调节，验证实验的结果也与网络药理学的预测结果一致。

综上所述，本研究通过网络药理学结合实验验证，多维度揭示了加味泽泻汤对高脂血症内皮功能障碍药效作用及其潜在机制。可以看出加味泽泻汤不仅具有降脂作用，同时能够调控改善内皮损伤，证实了其机制涉及炎症反应及脂质代谢紊乱，后续研究中可进一步研究该复方中的单体成分，充实药效物质基础研究，丰富该复方治疗本病的科学内涵，进一步探究炎症反应及血脂代谢的作用关系，为本研究的预测结果提供更加严谨的实验数据，为今后指导临床用药提供科学依据与实验支撑。

参考文献

[1] 胡盛寿，高润霖，刘力生，等.《中国心血管病报告 2018》概要[J]. 中国循环杂志，2019，34(3)：209－220.
[2] TAKAOKA M，ZHAO X H，LIM H Y，et al. Early intermittent hyperlipidaemia alters tissue macrophages to fuel atherosclerosis[J]. Nature，2024，634(8033)：457－465.
[3] SONG P P，SHEN X C. Proteomic analysis of liver in diet－induced Hyperlipidemic mice under Fructus Rosa roxburghii action[J]. J Proteom，2021，230：103982.
[4] DUGGAN J P，PETERS A S，TRACHIOTIS G D，et al. Epidemiology of coronary artery disease[J]. Surg Clin N Am，2022，102(3)：499－516.
[5] GALLO G，SAVOIA C. New insights into endothelial dysfunction in cardiometabolic diseases：potential mechanisms and clinical implications[J]. Int J Mol Sci，2024，25(5)：2973.
[6] RHEE M，LEE J，LEE E Y，et al. Lipid variability induces endothelial dysfunction by increasing inflammation and oxidative stress[J]. Endocrinol Metab，2024，39(3)：511－520.
[7] SUN H J，WU Z Y，NIE X W，et al. Role of endothelial dysfunction in cardiovascular diseases：the link between inflammation and hydrogen sulfide[J]. Front Pharmacol，2020，10：1568.
[8] WANG K，PENG S J，XIONG S F，et al. Naringin inhibits autophagy mediated by PI3K－Akt－mTOR pathway to ameliorate endothelial cell dysfunction induced by high glucose/high fat stress[J]. Eur J Pharmacol，2020，874：173003.
[9] KANG S J，KISHIMOTO T. Interplay between interleukin－6 signaling and the vascular endothelium in cytokine storms[J]. Exp Mol Med，2021，53(7)：1116－1123.
[10] WU J M，SHYY M，SHYY J Y，et al. Role of inflammasomes in endothelial dysfunction[J]. British J Pharmacology，2024，181(24)：4958－4972.
[11] GHOSH A，GAO L，THAKUR A，et al. Role of free fatty acids in endothelial dysfunction[J]. J Biomed Sci，2017，24(1)：50.
[12] ZHANG Y，GUO Z Q，WANG J，et al. Qinlian Hongqu decoction ameliorates hyperlipidemia *via* the IRE1－α/IKKB－β/NF－κb signaling pathway：Network pharmacology and experimental validation[J]. J Ethnopharmacol，2024，318：116856.
[13] 李文瑾. 当归芍药散对高脂血症大鼠血管内皮损伤保护作用机制研究[D]. 石家庄：河北中医学院，2021.
[14] 车梦竹，杨关林，闵冬雨，等. 加味香砂六君子汤对高脂血症小鼠脂肪组织 IL－6/JAK1/STAT3 通路的影响[J]. 时珍国医国药，2024，35(14)：3134－3138.
[15] 严林，李新健，张冰冰，等. 泽泻汤的研究现状[J]. 中国实验方剂学杂志，2021，27(16)：191－197.
[16] 张万龙，张树峰，范洪亮，等. 泽泻汤加味方治疗高血压最佳组方配伍的正交试验研究[J]. 世界中西医结合杂志，2013，8(2)：128－131，183.
[17] ZHANG P，ZHANG D F，ZHOU W A，et al. Network pharmacology：towards the artificial intelligence－based precision traditional Chinese medicine[J]. Brief Bioinform，2023，25：bbad518.
[18] LIAO M L，SHANG H H，LI Y Z，et al. An integrated approach to uncover quality marker underlying the effects of Alisma orientale on lipid metabolism，using chemical analysis and network pharmacology[J]. Phytomedicine，2018，45：93－104.
[19] XU F，CHEN J，ZHANG Y，et al. Molecular insight into the mechanism of lipid regulating effect of Alisma orientalis based on ACAT

[J]. Int J Biol Macromol,2020,158:1141 - 1162.
[20] LI B,CHEN X F,WU H S,et al. The anti - hyperlipidemia effect of Atractylodes macrocephala Rhizome increased HDL *via* reverse cholesterol transfer[J]. Heliyon,2024,10(7):e28019.
[21] WU J S,ZHANG F Q,RUAN H N,et al. Integrating network pharmacology and RT - qPCR analysis to investigate the mechanisms underlying ZeXie decoction - mediated treatment of non - alcoholic fatty liver disease[J]. Front Pharmacol,2021,12:722016.
[22] DOMINGO E,MARQUES P,FRANCISCO V,et al. Targeting systemic inflammation in metabolic disorders. A therapeutic candidate for the prevention of cardiovascular diseases? [J]. Pharmacol Res,2024,200: 107058.
[23] BALDISSERA M D,SOUZA C F,GRANDO T H,et al. β - caryophyllene reduces atherogenic index and coronary risk index in hypercholesterolemic rats: The involvement of cardiac oxidative damage [J]. Chem Biol Interact,2017,270:9 - 14.
[24] XIE Z S,LI E W,GAO G,et al. Zexie Tang targeting FKBP38/mTOR/SREBPs pathway improves hyperlipidemia[J]. J Ethnopharmacol,2022,290:115101.
[25] LI H M,CHEN X J,LUO D,et al. Protostane - type triterpenoids from *Alisma orientale* [J]. Chem Biodivers, 2017, 14(12):e1700452.
[26] 邓艳萍,金沐阳,张露,等. 基于网络药理学及分子对接技术探讨泽泻治疗动脉粥样硬化作用机制[J]. 新中医,2023,55(7):21 - 27.
[27] SHI K,XIAO Y X,DONG Y,et al. Protective effects of atractylodis lancea rhizoma on lipopolysaccharide - induced acute lung injury *via* TLR4/NF - κB and Keap1/Nrf2 signaling pathways *in vitro* and *in vivo*[J]. Int J Mol Sci,2022,23(24):16134.
[28] XUE W Y,GAO Y,LI Q W,et al. Immunomodulatory activity - guided isolation and characterization of a novel polysaccharide from Atractylodis macrocephalae Koidz[J]. Int J Biol Macromol,2020,161:514 - 524.
[29] DENG M,CHEN H J,LONG J Y,et al. Atractylenolides(Ⅰ,Ⅱ,and Ⅲ):a review of their pharmacology and pharmacokinetics[J]. Arch Pharmacal Res,2021,44(7):633 - 654.
[30] YAN L,MAHADY G,QIAN Y Y,et al. The essential oil from acori tatarinowii rhizome(the dried rhizome of *Acorus tatarinowii* schott) prevents hydrogen peroxide - induced cell injury in PC12 cells:a signaling triggered by CREB/PGC - 1α activation[J]. Evid Based Complementary Altern Med,2020,2020:4845028.
[31] WEN J X,YANG Y,HAO J J. Acori Tatarinowii Rhizoma:a comprehensive review of its chemical composition,pharmacology,pharmacokinetics and toxicity[J]. Front Pharmacol,2023,14:1090526.
[32] THAKARE M M,SURANA S J. β - Asarone modulate adipokines and attenuates high fat diet - induced metabolic abnormalities in Wistar rats[J]. Pharmacol Res,2016,103:227 - 235.
[33] LEE M J,LEE H S,PARK S D,et al. Protective effects of luteolin - 7 - O - β - D - glucuronide methyl ester from the ethyl acetate fraction of Lycopi Herba against pro - oxidant reactive species and low - density lipoprotein peroxidation[J]. J Enzyme Inhib Med Chem,2010,25(5):702 - 707.
[34] ZHANG W X,HU Y H,HE J Q,et al. Structural characterization and immunomodulatory activity of a novel polysaccharide from lycopi herba[J]. Front Pharmacol,2021,12:691995.
[35] BAILLY C. Pharmacological properties and molecular targets of alisol triterpenoids from alismatis rhizoma[J]. Biomedicines,2022,10(8):1945.
[36] LOU H X,FU W C,CHEN J X,et al. Alisol A 24 - acetate stimulates lipolysis in T3 - L1 adipocytes[J]. BMC Complementary Med Ther,2021,21(1):128.
[37] ZENG L,TANG W J,YIN J J,et al. Alisol a 24 - acetate prevents hepatic steatosis and metabolic disorders in HepG2 cells[J]. Cell Physiol Biochem,2016,40(3 - 4):453 - 464.
[38] KUMAR A. Phytochemistry,pharmacological activities and uses of traditional medicinal plant Kaempferia galanga L. - An overview [J]. J Ethnopharmacol,2020,253:112667.
[39] 颜伟泓,张鸿燕,李玲燕,等. 泽泻醇A对HepG2细胞脂质沉积的影响及其降脂活性研究[J]. 上海中医药杂志,2024,58(10):63 - 70.
[40] YAN P,WEI Y Y,WANG M Q,et al. Network pharmacology combined with metabolomics and lipidomics to reveal the hypolipidemic mechanism of*Alismatis rhizoma*in hyperlipidemic mice [J]. Food Funct,2022,13(8):4714 - 4733.
[41] PARK Y J,SEO M G,COMINGUEZ D C,et al. Atractylodes chinensis water extract ameliorates obesity *via* promotion of the SIRT1/AMPK expression in high - fat diet - induced obese mice[J]. Nutrients,2021,13(9):2992.
[42] CHEN Q Y,WANG D,GU Y,et al. Tangeretin prevents obesity by modulating systemic inflammation,fat browning,and gut microbiota in high - fat diet - induced obese C57BL/6 mice[J]. J Nutr Biochem,2022,101:108943.
[43] BALTA S. Endothelial dysfunction and inflammatory markers of vascular disease[J]. Curr Vasc Pharmacol,2021,19(3):243 - 249.
[44] KRAFT V A N,BEZJIAN C T,PFEIFFER S,et al. GTP cyclohydrolase 1/tetrahydrobiopterin counteract ferroptosis through lipid remodeling[J]. ACS Cent Sci,2020,6(1):41 - 53.
[45] BAKHSH A,MOYES D,PROCTOR G,et al. The impact of apical periodontitis,non - surgical root canal retreatment and periapical surgery on serum inflammatory biomarkers[J]. Int Endodontic J,2022,55(9):923 - 937.
[46] ISMAIL B S,MAHMOUD B,ABDEL - REHEIM E S,et al. Cinnamaldehyde mitigates atherosclerosis induced by high - fat diet *via* modulation of hyperlipidemia, oxidative stress, and inflammation [J]. Oxid Med Cell Longev,2022,2022:4464180.
[47] 陈与丰,陈建新,王雅蕾,等. 泽泻汤治疗梅尼埃病作用机制的网络药理学探讨[J]. 世界中医药,2021,16(7):1060 - 1066.
[48] JANG S A,PARK D W,KWON J E,et al. Quinic acid inhibits vascular inflammation in TNF - α - stimulated vascular smooth muscle cells[J]. Biomed Pharmacother,2017,96:563 - 571.
[49] ÇAKR I,LINING PAN P,HADLEY C K,et al. Sulforaphane reduces obesity by reversing leptin resistance[J]. eLife,2022,11:e67368.
[50] ATTIQ A,JALIL J,HUSAIN K,et al. A new prenylated benzoquinone from Cyathocalyx pruniferus abrogates LPS - induced inflammatory responses associated with PGE2,COX - 2 and cytokines biosynthesis in human plasma [J]. Inflammopharmacology, 2021, 29(3):841 - 854.
[51] YE J H,LI L,HU Z X. Exploring the molecular mechanism of action of Yinchen Wuling Powder for the treatment of hyperlipidemia, using network pharmacology, molecular docking, and molecular dynamics simulation[J]. BioMed Res Int,2021,2021: 9965906.
[52] SHEN Y T,SHEN X R,CHENG Y,et al. Myricitrin pretreatment ameliorates mouse liver ischemia reperfusion injury[J]. Int Immunopharmacol,2020,89:107005.

基于 PI3K/AKT/NF－κB 通路探究加味泽泻汤对高脂饲喂大鼠血管内皮保护作用机制

（正文见 120－128 页）

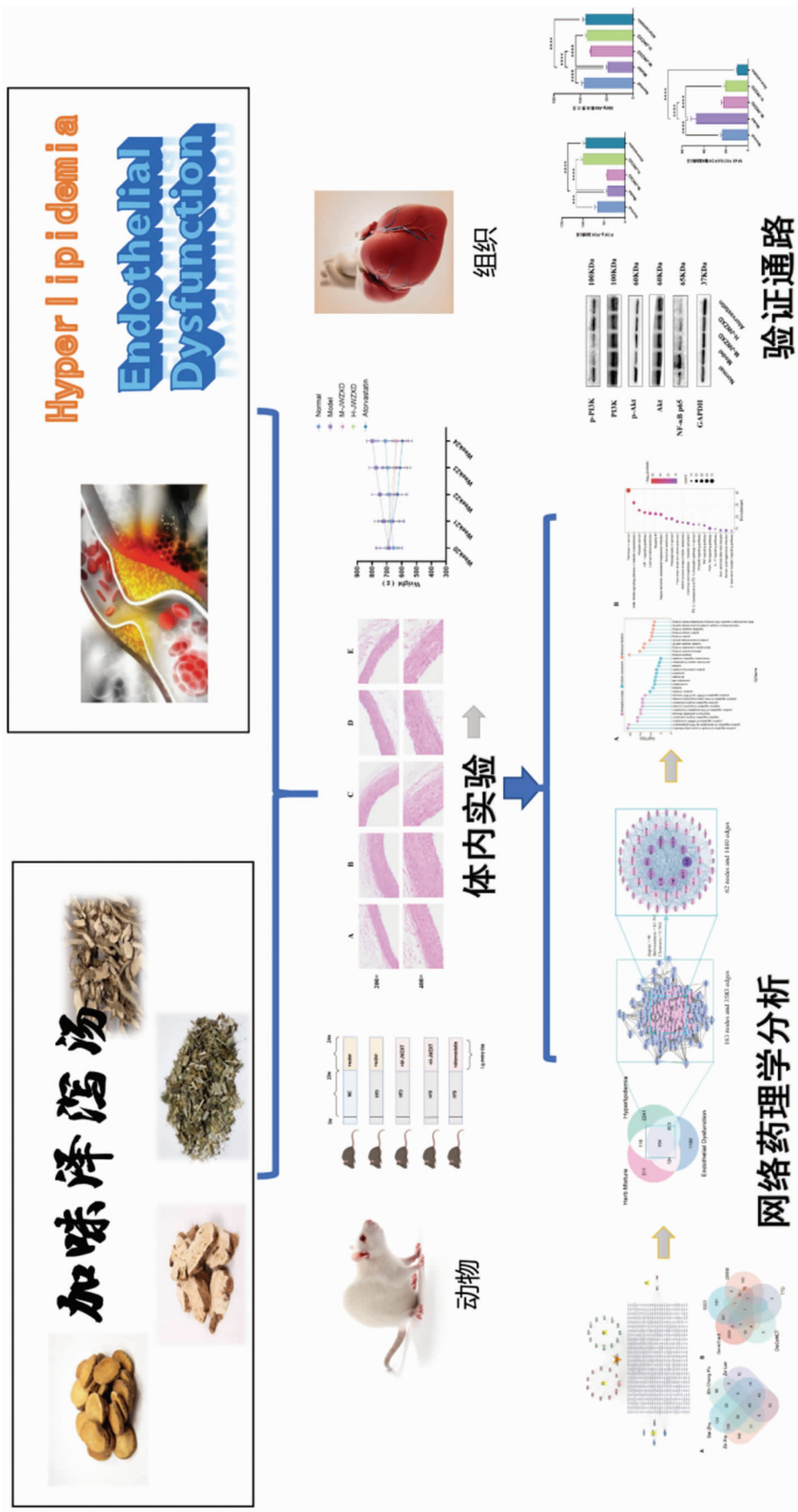


图 1　加味泽泻汤对高脂饲喂大鼠血管内皮保护机制流程图

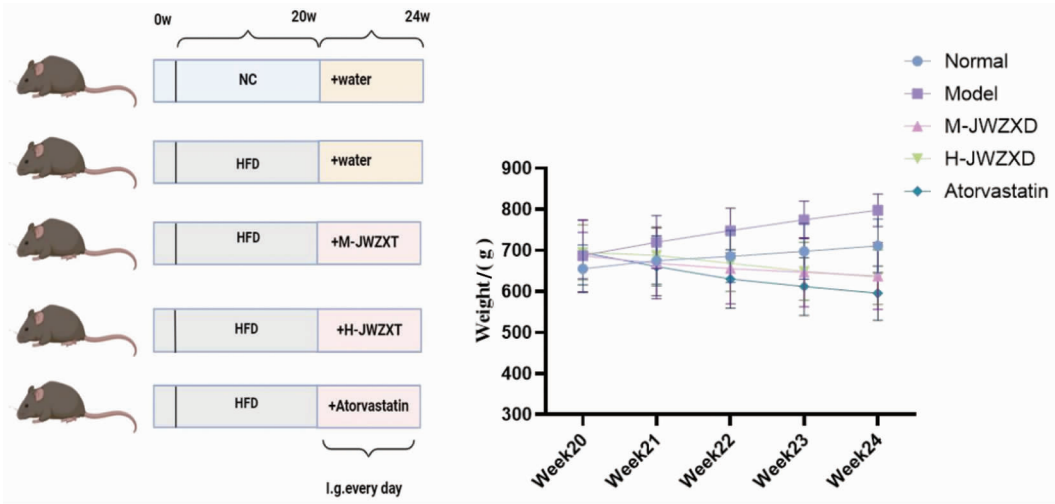
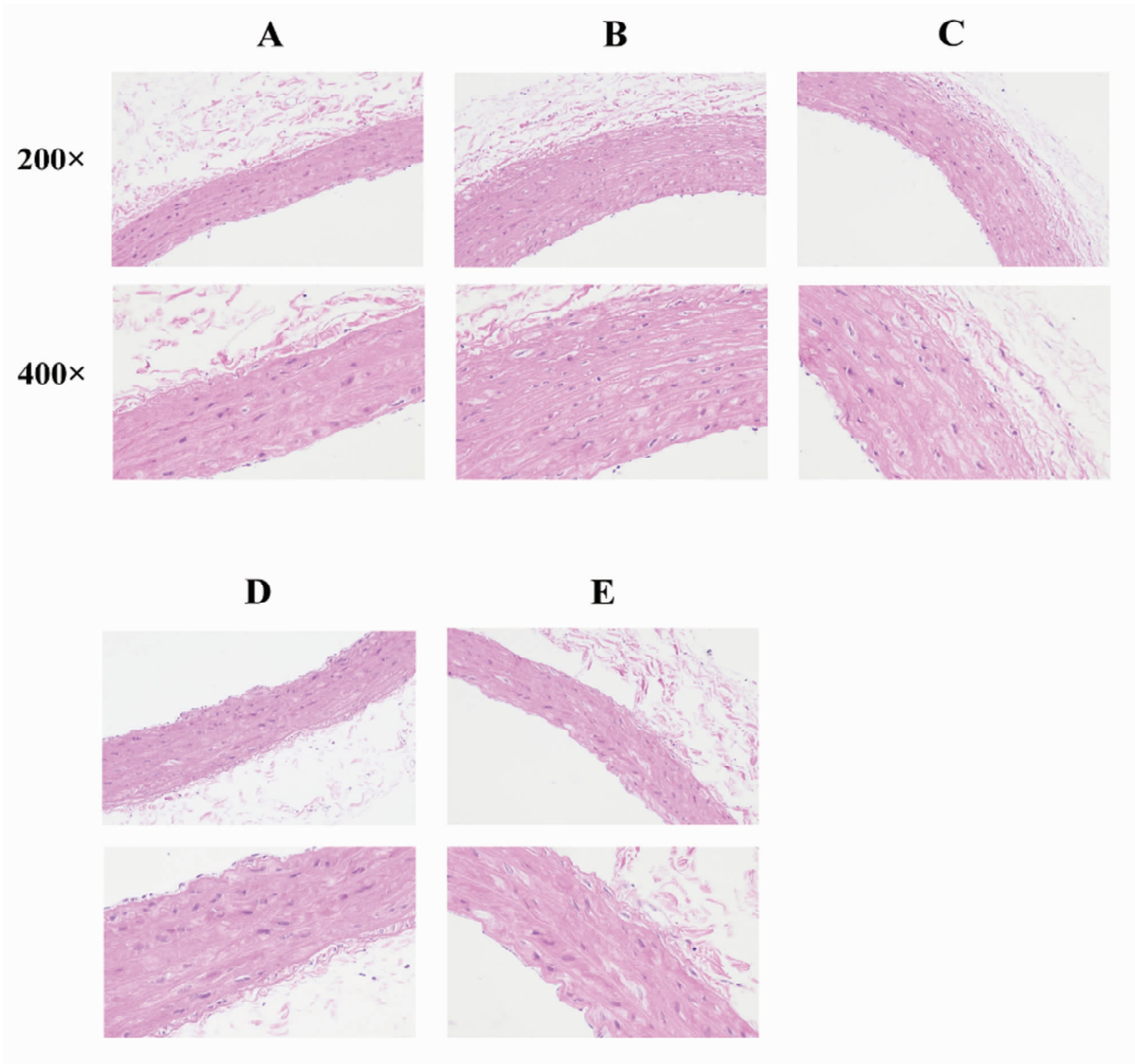


图 2　JWZXD 对各组大鼠体质量的影响



注：A. 正常组；B. 模型组；C. 加味泽泻汤正常剂量组；D. 加味泽泻汤高剂量组；E. 阿托伐他汀钙片组
图 3　各组大鼠主动脉病理组织学形态变化情况（HE 染色，×200，×400）

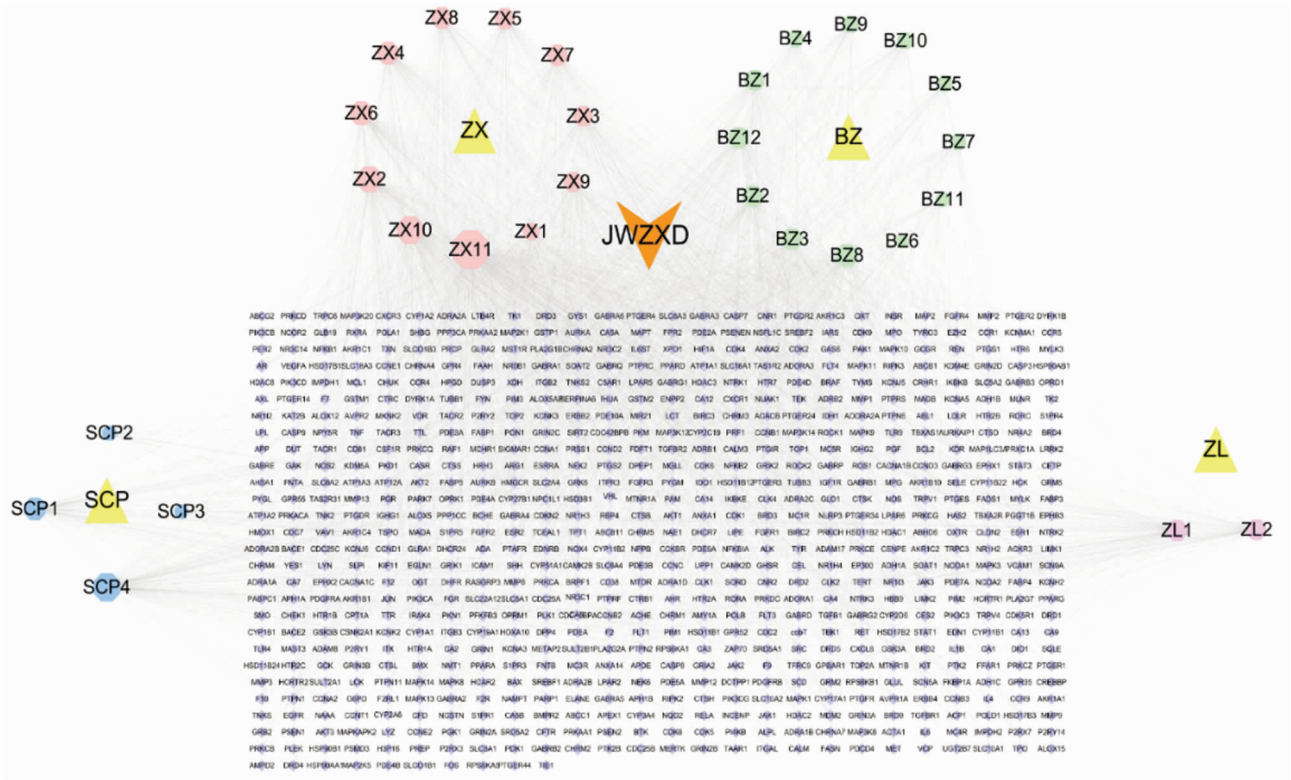
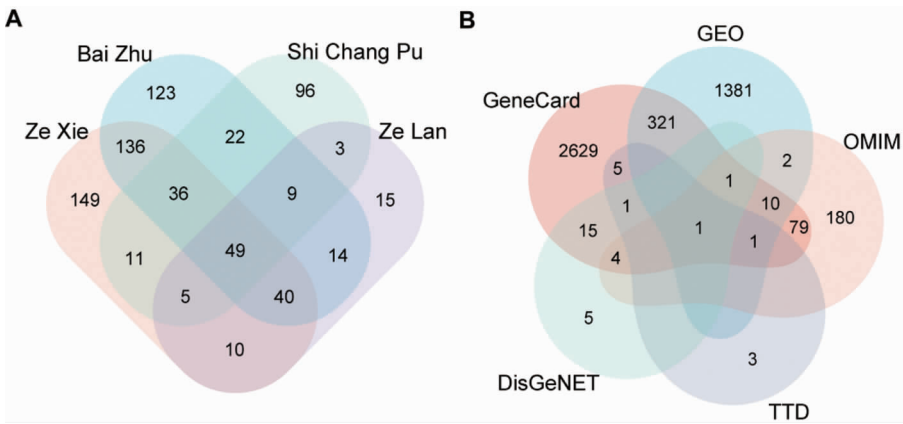


图 4　中药复方—活性成分—靶点网络可视化



注：A. 中药靶点韦恩图 B. 疾病数据库靶点韦恩图。

图 5　中药靶点与疾病数据靶点韦恩图

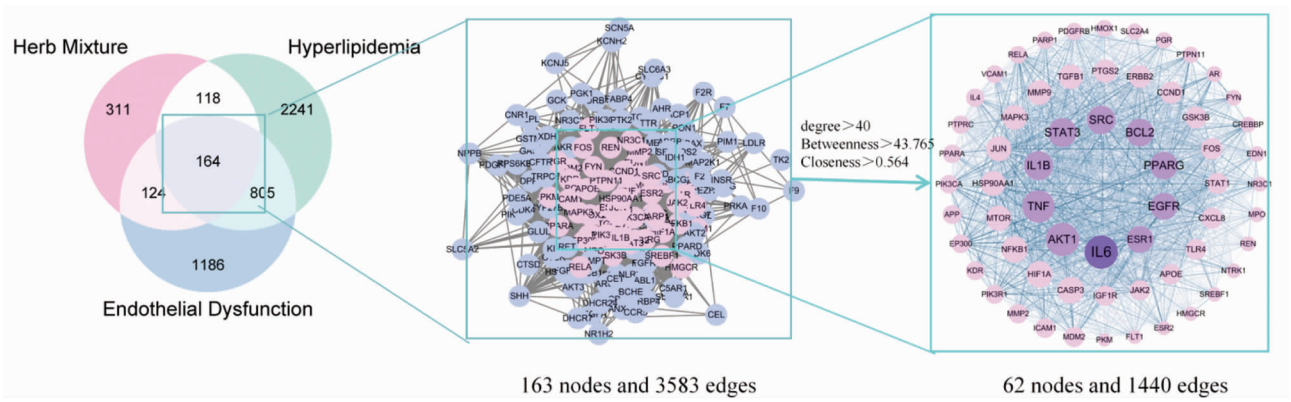
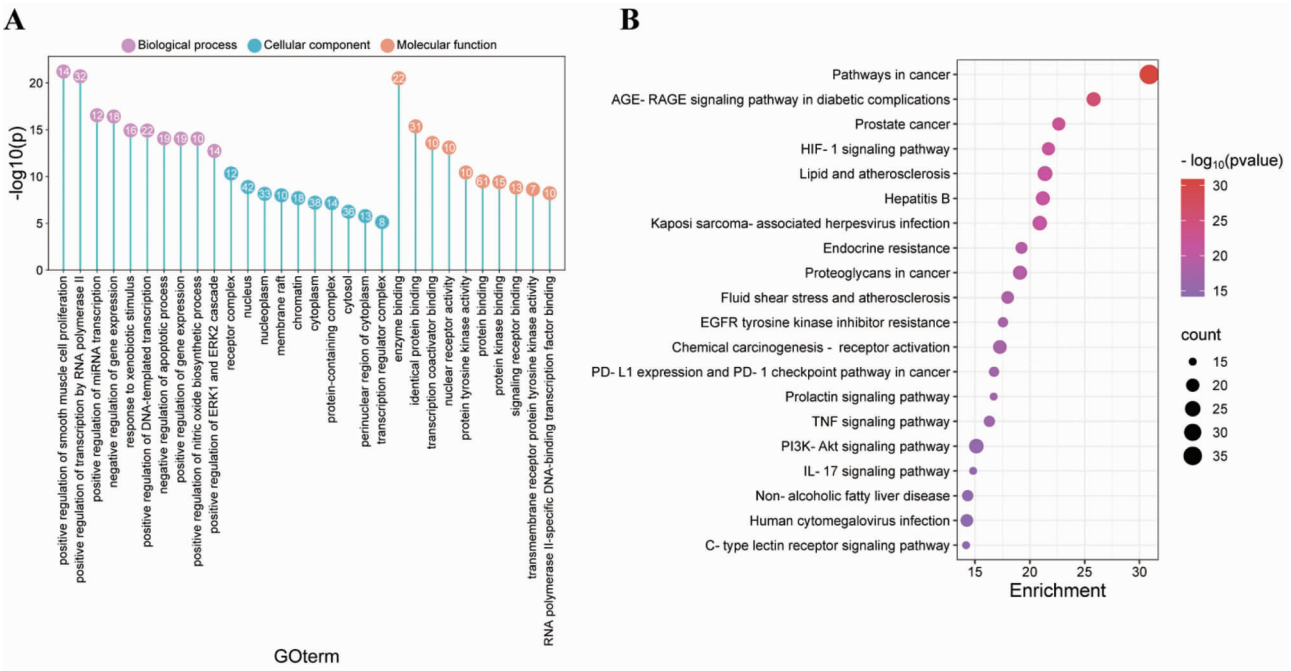
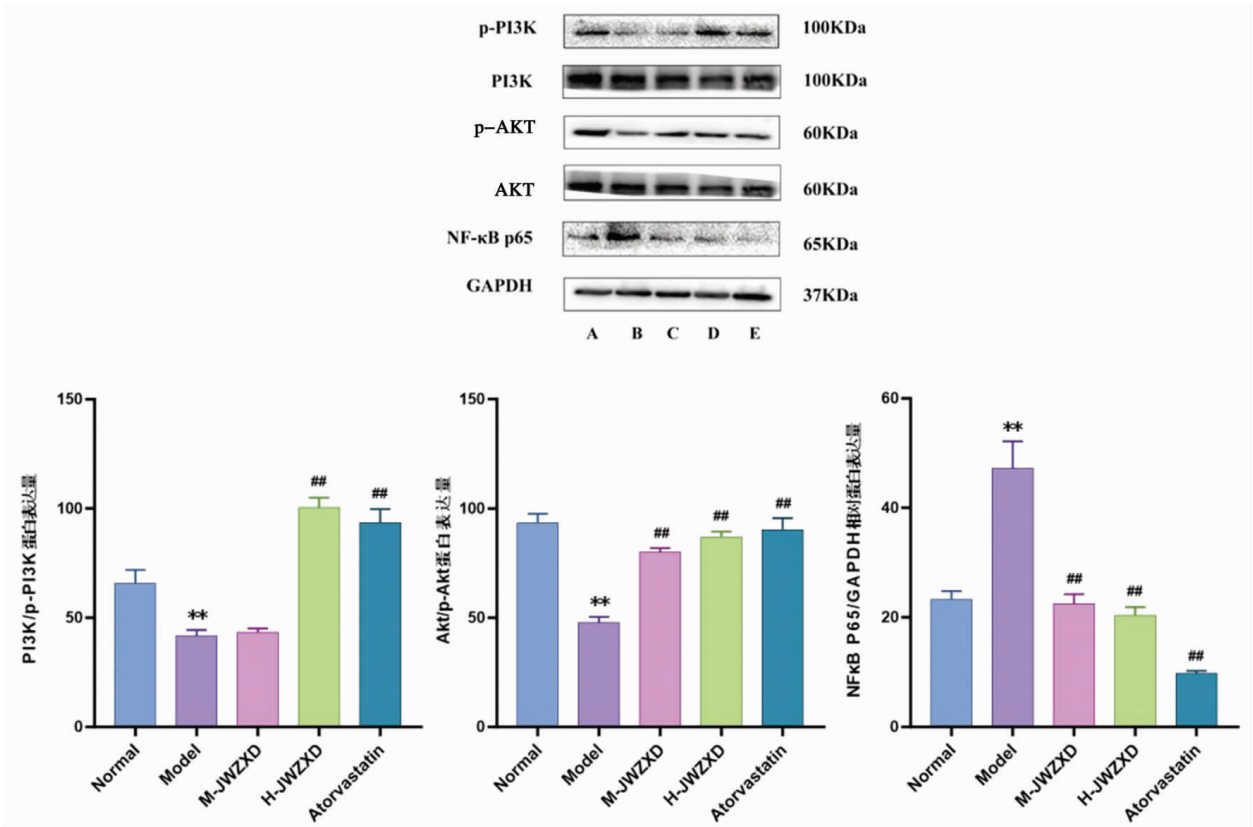


图 6　中药成分与疾病靶点交集韦恩图及拓扑分析关键靶点图



注：GO 功能富集分析图中紫色、蓝绿色、橙色圆圈分别表示 BP、CC、MF，圈中数字表示对应的基因数，柱的高低表示 GO 分析结果的显著性；KEGG 中 Y 轴表示通路注释名称，X 轴表示富集分析结果。A. GO 功能富集分析图 B. KEGG 功能富集分析气泡图。

图 7 富集分析图



注：A：正常组，B：模型组，C：加味泽泻汤正常剂量组，D：加味泽泻汤高剂量组，E：阿托伐他汀钙组。＊＊与正常组比较，$P<0.01$；##与模型组比较，$P<0.01$。

图 8 JWZXD 对高脂血症大鼠主动脉组织 PI3K/p－PI3K、p－Akt/Akt、NF－κB 蛋白表达的影响