

基于网络药理学及实验验证探究化橘红 治疗高脂血症的作用机制

郭钧榕, 邝思颖, 张卓雅, 黄祖润, 熊 平*

华南农业大学材料与化工学院, 广州 510642

摘要: 基于网络药理学及实验验证深入探究化橘红 (Citri Grandis Exocarpium, CGE) 治疗高脂血症的潜在作用机制。通过 TCMSP、STRING 等数据库筛选 CGE 活性成分及作用靶点与高脂血症靶点, 并与高脂血症相关靶点取交集构建蛋白互作网络, 对核心靶点进行 GO 功能注释和 KEGG 通路富集; 利用分子对接模拟活性成分与关键靶点的结合能力。进一步采用油酸诱导建立 HepG2 细胞脂质沉积模型, 给予不同浓度 CGE 处理, 通过油红 O 染色、甘油三酯 (triglyceride, TG) 和总胆固醇 (total cholesterol, TC) 含量检测以及 Western blot 分析对其作用进行验证。经筛选分析获得 20 个 CGE 潜在作用靶点, 核心活性成分包括柚皮素、异橙黄酮和芹菜素等, 关键靶点主要涉及半胱天冬酶 3 (cysteine-aspartic acid protease 3, CASP3)、丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 1 (serine/threonine kinase 1, AKT1) 和前列腺素内过氧化物合酶 2 (prostaglandin-endoperoxide synthase 2, PTGS2) 等。GO 富集提示 CGE 可能通过调控凋亡过程、脂多糖应答及蛋白质磷酸化等生物过程发挥作用; KEGG 富集结果显示其主要涉及代谢通路及磷脂酰肌醇 3-激酶/蛋白激酶 B (phosphoinositide 3-kinase/protein kinase B, PI3K/AKT) 信号通路。分子对接结果表明核心成分与关键靶点具有良好的结合活性, 其中柚皮素与 CASP3 (-6.5 kcal/mol) 和芹菜素与 AKT1 (-6.15 kcal/mol) 表现出最佳结合能。体外实验结果显示, 0.2 mmol/L 油酸可成功诱导 HepG2 细胞脂质沉积模型, CGE 处理能剂量依赖性减少脂滴积聚, 油红 O 阳性面积由 39.89% 显著降低至 19.4% ~ 23.92%, 并显著降低 TG 和 TC 含量, 其中 2 mg/mL 组作用最为显著。同时, CGE 通过抑制 PI3K/AKT 信号通路, 进而阻断脂质合成。综上, CGE 可通过调节肝细胞脂质代谢相关信号通路, 减少脂质沉积并降低细胞内 TG 和 TC 水平, 发挥潜在的降脂作用。

关键词: 化橘红; 高脂血症; 网络药理学; 分子对接; HepG2 细胞

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1001-6880(2026)9-2021-14

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2026.9.016

CSTR: 32307.14.1001-6880.2026.9.016

Mechanism of Citri Grandis Exocarpium in the treatment of hyperlipidemia based on network pharmacology and experimental validation

GUO Jun-rong, KUANG Si-ying, ZHANG Zhuo-ya, HUANG Zu-run, XIONG Ping*

College of Materials and Chemical Engineering, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China

Abstract: This study aims to explore the mechanism of Citri Grandis Exocarpium (CGE) in the treatment of hyperlipidemia based on network pharmacology and experimental verification. The active components and potential targets of CGE in the treatment of hyperlipidemia were screened through databases such as TCMSP and STRING. The core targets were analyzed through GO functional annotation and KEGG pathway enrichment. The protein-protein interaction network was constructed using the STRING database. Molecular docking technology was used to simulate the binding ability between the active compounds of CGE and the key target proteins. Furthermore, an oleic acid-induced HepG2 cell model was established, and Oil Red O staining, triglyceride (TG) and total cholesterol (TC) assays, as well as Western blot analysis were used to verify the lipid-lowering effect of CGE. After screening and analysis, 20 potential targets of CGE were obtained. The core active compounds included naringenin, isosinensetin, and apigenin. The key targets related to the treatment of hyperlipidemia mainly included cys-

收稿日期: 2025-11-21 接受日期: 2026-04-17

基金项目: 国家科技部重点研发专项 (2018YFC1706702)

* 通信作者 E-mail: xp0000542003@scau.edu.cn

teine-aspartic acid protease 3 (CASP3), serine/threonine kinase 1 (AKT1), and prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (PTGS2). GO enrichment analysis indicated that the potential targets of CGE were mainly involved in biological processes such as apoptosis, response to lipopolysaccharide, and protein phosphorylation. KEGG pathway enrichment suggested that CGE was closely related to metabolic pathways and the phosphoinositide 3-kinase/protein kinase B (PI3K/AKT) signaling pathway. Molecular docking results showed that the core components exhibited favorable binding activities with the key targets, among which naringenin with CASP3 (-6.5 kcal/mol) and apigenin with AKT1 (-6.15 kcal/mol) showed the best binding energies. In vitro experiments showed that 0.2 mmol/L oleic acid successfully induced lipid accumulation in HepG2 cells, while CGE treatment reduced intracellular lipid droplets in a dose-dependent manner, significantly decreasing the Oil Red O positive area from 39.89% to 19.4%-23.92%, and markedly lowering TG and TC levels. In addition, CGE inhibited lipid synthesis by suppressing the PI3K/AKT signaling pathway. This study reveals that CGE alleviates lipid accumulation in HepG2 cells by regulating lipid metabolism-related signaling pathways, which provides a theoretical basis for further investigation of its lipid-lowering mechanism.

Key words: Citri Grandis Exocarpium; hyperlipidemia; network pharmacology; molecular docking; HepG2 cells

高脂血症(hyperlipidemia)是一种脂质代谢紊乱引发的慢性疾病,与动脉粥样硬化、冠心病及脑卒中等心脑血管疾病密切相关。2017年,全球范围内因非高密度脂蛋白胆固醇(non-high-density lipoprotein cholesterol, non-HDL-C)导致的死亡约390万人^[1],而到2019年血浆低密度脂蛋白胆固醇(low-density lipoprotein cholesterol, LDL-C)水平升高所导致的死亡约440万^[2]。近年来,“快节奏”的生活方式和“重油重辣”饮食习惯影响着人们的健康,高脂血症患病人数急剧上升。因此,预防和治疗高脂血症以减少心血管疾病等慢性疾病的发病率,已成为社会日益关注的问题。为此,采取有效措施应对这一健康挑战显得尤为重要,目前临床治疗以他汀类药物为主,阿托伐他汀和辛伐他汀是治疗高脂血症的主要药物,其可以调节血脂代谢和胆固醇合成,但长期使用可能伴随肝肾功能损伤、肌病等副作用^[3],而新兴的前蛋白转化酶枯草溶菌素/激肽释放酶9型(proprotein convertase subtilisin/kexin type 9, PCSK9)抑制剂的高成本制约其可及性,其价格(每年超过14 500美元)比通用型他汀类药物高出100多倍,高昂自付费用可能会限制患者使用该药物,降低其长期治疗的依从性^[4]。因此亟需探索兼具疗效与安全性和低成本的天然药物替代方案。在此背景下,中医药多成分、多靶点的协同作用特点受到广泛关注。

化橘红(Citri Grandis Exocarpium, CGE)作为传统中药,其性温、味辛苦,归肺脾经,具有燥湿化痰、理气宽中的功效^[5]。CGE中含有多种黄酮类化合物,主要包括柚皮素、野漆树苷、芹菜素、原儿茶酸、积属苷、新橙皮苷、枸橼苷、樱桃苷和新北美圣草苷

等^[6]。有研究表明,CGE可能通过其三种活性成分——芹黄素、橙皮内酯水合物和柚皮素,调控孕烷X受体/细胞色素P450 3A4(pregnane X receptor/cytochrome P450 3A4, PXR/CYP3A4)通路的表达,从而发挥调血脂作用^[7]。CGE 95%乙醇提取物可显著降低高脂血症大鼠血清中的三酰甘油(triglyceride, TG)和总胆固醇(total cholesterol, TC)水平。其降脂作用可能与多种活性成分,包括柚皮素、橙皮内酯水合物、芹菜素、野漆树苷及橙皮苷等有关。值得注意的是,高脂血症与肝损伤之间存在密切的双向关联:高脂血症可诱发肝损伤,而肝功能受损亦会进一步加剧脂质代谢紊乱^[8]。其中,柚皮素被认为是CGE发挥关键药理效应的核心活性成分之一。Zhang等^[9]在研究柚皮素对急性肝损伤小鼠的作用时发现,柚皮素可显著降低血清丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase, ALT)和天冬氨酸氨基转移酶(aspartate aminotransferase, AST)水平。Zang等^[10]在脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)诱导的肝损伤模型研究中,同样地发现柚皮素给药组可显著降低小鼠血清ALT和AST水平,表明其在一定程度上具有改善肝损伤的作用。以上结果均表明柚皮素这单一成分对肝损伤有一定的保护作用。

近年来,网络药理学与分子对接技术的融合为解析中药活性分子的提供了高效工具。本研究拟通过网络药理学、分子对接及体外实验,阐明CGE对高脂血症的治疗作用。通过TCMSP等数据库筛选CGE活性成分-疾病靶点交集,构建蛋白质相互作用(protein-protein Interaction, PPI)网络及通路富集分析。利用分子对接验证核心成分与关键靶点的结合能力,并通过体外实验检测细胞内的TG和TC水

平,以及 CGE 对 HepG2 细胞腺苷酸活化蛋白激酶 (adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase, AMPK)、磷酸化蛋白激酶 B (phosphorylated protein kinase B, p-AKT) 和固醇调节元件结合蛋白 1 (sterol regulatory element-binding protein 1, SREBP-1) 蛋白表达水平的影响,旨在阐明 CGE 调控脂代谢的潜在分子机制,对治疗药物核心成分、通路的选择具有前瞻性和指导意义,为开发新型降脂中药制剂提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

人肝癌细胞 (HepG2) (批号:BNCC338070,北纳创联生物科技有限公司)。

CGE 水提物 (批号:HP-200501,广州市香雪制药有限公司);DMEM 高糖培养基、青霉素/链霉素溶液 (批号:WP9405010、D5525300,上海翌圣生物科技有限公司);胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) (批号:164210-50,武汉普诺赛生命科技有限公司)、胰蛋白酶 (批号:C25200-056,赛默飞世尔科技有限公司),;MTT (批号:33124077AZ,兰杰柯科技有限公司);DMSO (批号:2025010103,广州化学试剂厂);油红 O (批号:H08J11Y117921,上海源叶生物科技有限公司);油酸 (批号:20191115B,天津市富宇精细化工有限公司);Mayer 苏木素染色液 (批号:G1080,北京索莱宝科技有限公司);TG、TC 含量检测试剂盒 (批号:A110-1-1、A111-1-1,南京建成生物工程研究所);苯甲基磺酰氟 (phenylmethylsulfonyl fluoride, PMSF)、RIPA 裂解液 (批号:G2008-1ML、G2002-100ML,武汉塞维尔生物科技有限公司);阿卡地新 (5-aminoimidazole-4-carboxamide 1- β -D-ribofuranoside, AICAR) (批号:S1515-5 mg,美国 Med-ChemExpress LLC 公司);细胞 AMPK 一抗、p-AKT 一抗、SREBP-1 一抗和 β -肌动蛋白 (β -actin) 抗体 (批号:ab133448、ab81283、ab313881、ab8227,英国 Abcam 公司);即用型 HRP 标记羊抗兔二抗 (批号:PR30011,武汉三鹰生物技术有限公司)。

1.2 仪器

JY92-II DN 超声波细胞粉碎机 (宁波新芝生物科技股份有限公司);800TS 酶标仪 (美国 BIOTEK 公司);1300A2 生物安全柜 (美国 Thermo Fisher 公司);Heracell VIOS 160i 细胞培养箱 (美国 Thermo Fisher 公司);Mini-PROTEAN[®] Tetra 电转仪、Chem-Doc XRS + 凝胶成像系统 (美国 BIO-RAD 公司);SI

Vortex-Genie2 涡旋振荡器 (美国 Scientific Industries 公司);ECLIPSE 型倒置显微镜 (日本 Nikon 公司)。

1.3 网络药理学分析

1.3.1 CGE 有效化学成分筛选和活性成分潜在靶点的获取

通过 TCMSP 平台 (<https://www.tcmsp-e.com/tcmsp.php>) 检索 CGE 的化学成分。基于药代动力学特征和药物相似性,设定口服生物利用度 (oral bioavailability, OB) $\geq 30\%$ 和类药性 (drug-likeness, DL) ≥ 0.18 为潜在活性成分的筛选标准。同时,通过文献报道补充 CGE 中具有明确药理活性的化学成分信息。利用 PubChem 数据库 (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) 获取 CGE 活性成分的结构特征,随后通过 SwissTargetPrediction 平台 (<http://www.swisstargetprediction.ch/>) 进行系统性预测靶点,采用概率阈值 ($P > 0.1$) 对预测结果进行可靠性筛选。

1.3.2 高脂血症疾病靶点的获取及疾病-药物交集靶点的获取

通过多数据库联合检索获取高脂血症相关靶点:基于 GeneCards (<https://www.genecards.org/>)、DisGeNET (<https://www.disgenet.org/>) 及 OMIM (<https://www.omim.org/>) 检索高脂血症致病靶点,并对其标准化处理 (包括基因名称统一、物种筛选及冗余数据剔除)。利用 Venny 2.1.0 在线交互工具 (<https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/>) 构建靶点互作网络,取 CGE 候选活性成分作用靶点与高脂血症靶点交集。

1.3.3 蛋白互作网络构建、KEGG 信号通路和 GO 功能富集分析

基于 STRING 数据库 (<https://string-db.org/>) 构建 CGE 活性成分-高脂血症潜在靶点 PPI 网络图,并下载包含节点信息的 TSV 格式文件。运用 Cytoscape 3.10.0 软件筛选 $>$ 度值 (degree)、接近中心性 (closeness) 和介数中心性 (betweenness) 对应数值的靶点,即为关联性高的核心靶点。在可视化网络图中,节点尺寸与颜色梯度反映靶点重要性等级,关联边的粗细与色度表征蛋白相互作用强度,其中核心靶点位于中心枢纽位置。

基于 DAVID 数据库 (<https://david.ncifcrf.gov/>) 获取 GO 和 KEGG 富集分析结果。随后应用微生信分析平台 (<https://www.bioinformatics.com.cn/>) 进行解析:GO 富集分析揭示核心靶点的功能

特征,包括生物过程(biological process, BP)、细胞组分(cellular component, CC)和分子功能(molecular function, MF)3个方面;KEGG 富集分析进行通路映射,以确认与脂质代谢调控相关联的信号通路。

1.3.4 CGE 有效活性成分-交集靶点-通路网络图构建

通过 KEGG 通路分析,以 $P < 0.05$ 作为统计学显著性阈值,错误发现率(false discovery rate, FDR) < 0.05 筛选靶标的主要通路,利用 Cytoscape 3.10.0 绘制有效活性成分-交集靶点-通路网络图。

1.3.5 CGE 活性成分与关键靶基因的分子对接验证

在分子对接上,将 CGE 治疗高脂血症的相关核心活性成分作为小分子配体(ligands),PPI 网络中重要核心靶点作为受体蛋白,通过 RCSB PDB 数据库(<https://www.rcsb.org/>)下载受体分子的晶体结构和核心活性成分的 3D 结构,并去除水分子和配体。运用 AutoDock Tools 1.5.7 软件进行分子对接,记录结合能大小,并在 PyMOL 2.1.1 软件导出可视化结果。

1.4 体外实验验证

1.4.1 HepG2 细胞培养

采用 DMEM 完全培养基(含 10% FBS 和 1% 青霉素/链霉素)复苏细胞,置于 37 ℃、5% CO₂ 培养箱中培养。培养 2 d 后,使用 0.25% 胰蛋白酶对细胞进行消化并传代培养。传代 3 代待细胞状态稳定后,取生长对数期细胞进行实验。

1.4.2 药物毒性检验

使用 MTT 法检测 CGE 对 HepG2 细胞的毒性,评价其对细胞增殖的影响,筛选出合适的药物浓度与给药时间。取生长对数期的细胞,以 0.5×10^5 /mL 接种至 96 孔细胞培养板上,每孔加入 100 μL 的细胞悬液,置于 37 ℃、5% CO₂ 的培养箱中培养 24 h。细胞密度约 80% 时更换含有不同浓度的 CGE 新鲜培养基(仅含 CGE 与 DMEM 培养基)。每孔加入 20 μL 5 mg/mL 的 MTT 溶液,继续在培养箱中孵育 4 h。随后弃去 MTT 溶液,每孔加入 150 μL DM-SO,置于涡旋仪上充分振荡至蓝紫色甲臞结晶完全溶解。用酶标仪 490 nm 检测各孔吸光度(A)。将对照组的细胞活力视为 100%,细胞活力(R)通过公式(1)计算,筛选出 CGE 的低、中、高药物浓度。

$$R = (A_s - A_b) / (A_c - A_b) \times 100\% \quad (1)$$

式中: A_s 为药物处理组吸光度值; A_c 为模型组

的吸光度; A_b 为含药物但不含细胞的培养基吸光度值。

1.4.3 造模剂配制及毒性测验

吸取油酸对照品 10 μL,加入 305 μL 0.1 mol/L NaOH 溶液,70 ℃ 水浴加热 30 min,使油酸充分溶解,随后用 10% BSA 溶液稀释,制备 10 mmol/L 油酸母液,经 0.22 μm 微孔滤膜过滤后,于 -20 ℃ 保存备用。使用 DMEM 培养基将油酸母液稀释至不同浓度,并采用 MTT 法(方法同“1.4.2”)检测不同浓度油酸对 HepG2 细胞的毒性,选择对细胞无毒害作用的浓度进行下一步实验。

1.4.4 建立细胞脂质沉积模型与给药

有研究表明,油酸可诱导 HepG2 细胞脂质积累^[11],故本实验选用 HepG2 细胞建立脂质沉积模型。将处于生长对数期的细胞悬液浓度调整为 2×10^5 /mL,接种于 24 孔细胞培养板上,每孔加入 1 mL 的细胞悬液,置于 37 ℃、5% CO₂ 的培养箱中培养 24 h。细胞密度约 80% 时,模型组更换为预先配制好的含油酸的 DMEM 培养基,对照组更换为不含油酸的 DMEM 培养基,每孔 1 mL,继续培养 24 h。文献报道,适宜浓度的油酸可在保证细胞活力的同时诱导 HepG2 细胞发生脂肪变性,表现为细胞内红色脂滴明显增多,提示模型成功建立^[12]。其中 0.25、0.5 mmol/L 浓度对其细胞活力影响较小,在此基础上,本研究设置不同油酸浓度梯度验证^[13]。诱导成功后弃去原培养基,加入含低、中、高剂量 CGE 的培养基继续培养 24 h,使用油红 O 及苏木素染色观察。

1.4.5 油红 O 染色法检测 CGE 对 HepG2 细胞脂滴生成减缓作用

参考 Lin 等^[14]方法,对不同处理组的 HepG2 细胞进行油红 O 和苏木素染色在显微镜下观察细胞形态,若细胞内出现鲜艳的橙红色脂滴即为染色成功。随后使用 ImageJ 软件进行油红 O 阳性区域的半定量分析。

1.4.6 细胞内 TG 和 TC 含量测定

取生长对数期 HepG2 细胞,调整细胞悬液浓度为 1×10^6 /mL,每孔接种 2 mL 于 6 孔板中,培养 24 h 使细胞贴壁生长。弃去培养基后,除对照组外,其余各组加入含油酸的 DMEM 培养基进行造模,继续培养 24 h。随后弃去培养基,给药组分别加入含低、中、高剂量 CGE 的 DMEM 培养基继续培养 24 h。培养结束后,按照 TG 和 TC 检测试剂盒说明书测定

细胞内 TG 和 TC 含量。

1.4.7 Western blot 检测细胞降脂相关蛋白水平的表达

HepG2 细胞以 1×10^6 个/孔接种于 6 孔培养板,培养 24 h 后进行分组处理。对照组加入 DMEM 培养基,其余各组均加入含油酸培养基;模型组仅以油酸培养基培养;AICAR 为 AMPK 激活剂,并以此作为阳性对照,后称 AICAR 组。AICAR 组在油酸培养基基础上加入 1 mmol/L AICAR 处理。给药组分别加入低、中、高浓度的 CGE 培养 24 h,随后使用含 1% PMSF 的 RIPA 裂解液,于冰上裂解细胞 10 min,于 4 ℃、 $12\,000 \times g$ 离心 10 min,收集上清,即得细胞蛋白溶液,依据二喹啉甲酸蛋白定量法计算上样量。经过电泳、转膜、封闭、孵育一抗、孵育二抗、显影。

采用 ImageJ 软件分析目标蛋白条带的灰度值,分析蛋白质的相对表达水平。

1.4.8 统计分析方法

本研究的数据分析均采用 GraphPad Prism 8 软件完成。数据结果以平均值 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。此外,两组间差异采用 *t* 检验。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 网络药理学

2.1.1 CGE 的活性成分

利用 TCMSP 数据库,筛选出符合标准的潜在活性成分,并结合有关文献报道,增加了桔皮素、野漆树苷和异橙皮内酯等潜在活性成分,最终获得 25 个活性成分(见表 1)。

表 1 CGE 潜在活性成分基本信息

Table 1 Basic information on potential active components of Citri Grandis Exocarpium

化合物序号 Compound code	Mol ID	成分名称 Component name	口服生物利用度 OB(%)	类药性 DL
HJH1	MOL005812	柚皮苷 Naringin	6.92	0.78
HJH2	MOL000010	野漆树苷 Rhoifolin	6.68	0.77
HJH3	MOL004328	柚皮素 Naringenin	59.29	0.21
HJH4	MOL013279	三甲基芹菜素 5,7,4'-Trimethylapigenin	39.83	0.30
HJH5	MOL000008	芹菜素 Apigenin	23.06	0.21
HJH6	MOL009088	新橙皮苷 Neoeriocitrin	3.93	0.73
HJH7	MOL003621	橙皮内酯水合物 Merancin hydrate	43.61	0.17
HJH8	MOL013382	橙皮内酯 Meranzin	26.03	0.17
HJH9	MOL013331	异橙皮内酯 IsoMeranzin	42.78	0.15
HJH10	MOL013277	异橙黄酮 Isosinensetin	51.15	0.44
HJH11	MOL001942	异欧前胡素 Isoimperatorin	45.46	0.23
HJH12	-	水合氧化前胡素 Oxypeucedanin hydrate	-	-
HJH13	MOL001945	佛手苷内酯 Bergapten	42.21	0.13
HJH14	MOL010267	番茄红素 Tangeretin	32.57	0.51
HJH15	MOL001798	新橙皮苷 Neohesperidin_qt	71.17	0.27
HJH16	MOL007930	橙皮苷 Hesperidin	13.33	0.67
HJH17	MOL013276	枸橼苷 Poncirin	36.55	0.74
HJH18	MOL005785	呋喃香豆素 Bergaptol	24.22	0.12
HJH19	MOL002341	橙皮素 Hesperetin	70.31	0.27
HJH20	MOL005814	桔皮素 Tangeretin	21.37	0.42
HJH21	MOL005828	川陈皮素 Nobiletin	61.67	0.52
HJH22	MOL012682	香豆素 5,7-Dihydroxycoumarin	56.93	0.07
HJH23	MOL001803	甜橙黄酮 Sinensetin	50.55	0.44
HJH24	MOL000358	β -谷甾醇 Beta-Sitosterol	36.91	0.75
HJH25	MOL005849	香风草甙 Didymin	38.55	0.24

注:“-”表示未从数据库中获得该内容。
Note:“/” indicates that the content was not obtained from the database.

2.1.2 CGE 与高脂血症潜在作用靶点的获取

利用 SwissTargetPrediction 数据库,对 25 种 CGE 潜在活性成分进行预测,通过限定筛选可能值($P > 0.1$),剔除在 SwissTargetPrediction 数据库中无预测靶点的成分:番茄红素、橙皮内酯水合物、水合氧化前胡素、佛手苷内酯和呋喃香豆素。随后合并 20 种成分的预测靶点并去除冗余基因,最终获得 360 个非冗余靶点;从 GeneCards 等数据库筛选得到 3 165 个疾病靶点。利用 Venny 2.1.0 在线工具获得 140 个潜在作用药物-疾病交集靶点,并绘制韦恩图(见图 1)。

2.1.3 CGE 治疗高脂血症的 PPI 网络

将 140 个靶点经 STRING 数据库映射后,并获取 CGE 治疗高脂血症潜在靶点。在 Cytoscape 3.10.0 软件中利用 Centiscape 2.2.0 插件,筛选出 29 个关键靶点,并绘制其核心靶点网络图(见图 2)。这些靶点在治疗高脂血症的过程中起重要作用,其中半胱天冬酶 3 (Caspase-3, CASP3)、前列腺素内过氧化物合酶 2 (prostaglandin-endoperoxide synthase 2, PTGS2) 以及 AKT1 等为核心靶点,可能通过调控脂质代谢、炎症反应和细胞凋亡等通路,在改善高脂血症病理进程中发挥协同作用。

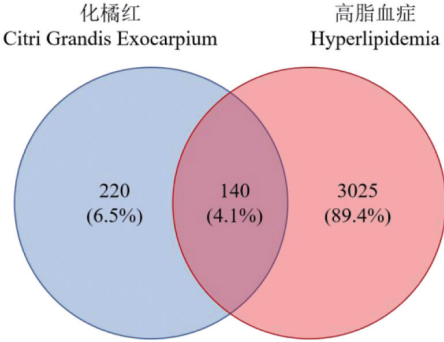


图 1 CGE 与高脂血症潜在作用靶点韦恩图

Fig. 1 Venn diagram of potential overlapping targets between CGE and hyperlipidemia

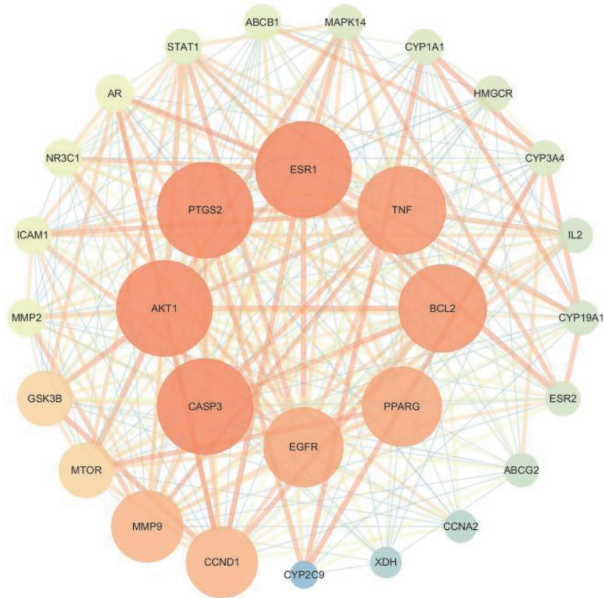


图 2 CGE 治疗高脂血症核心靶点 PPI 网络

Fig. 2 PPI network of core targets of CGE against hyperlipidemia

2.1.4 GO 功能富集分析

利用 DAVID 在线平台,进行 BP、CC 和 MF 的

GO 功能富集分析(见图 3)。GO 功能富集揭示了 CGE 调控高脂血症的复杂作用网络。BP 分析得到

550 个功能条目,注释到细胞间信号调控、应激应答系统和代谢调控轴等方面;共 78 个 CC,主要涉及膜相关结构、能量与代谢中心和分泌与信号传递等方面;共 204 个 MF,包括酶结合 (enzyme binding)、蛋

白质同源二聚化活性 (protein homodimerization activity) 和蛋白丝氨酸/苏氨酸激酶活性 (protein serine/threonine kinase activity) 等。分别取排行前 10 条目导入微生信平台分析 (见图 3)。

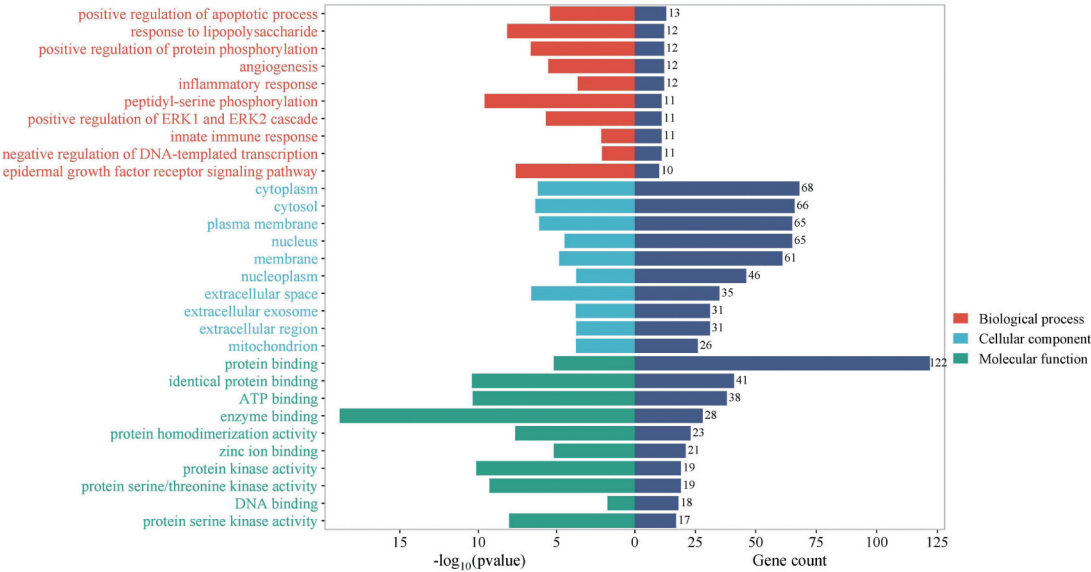


图 3 CGE 治疗高脂血症核心靶点的 GO 功能分析

Fig. 3 GO functional enrichment analysis of core targets of CGE against hyperlipidemia

2.1.5 KEGG 功能富集分析

为系统揭示 CGE 干预高脂血症的作用网络,KEGG 通路富集分析获得的 130 个潜在核心靶和 150 条与高脂血症治疗相关的信号通路。基于通路-靶点关联度的降序排列,选取前 10 条关键通路通过微生信平台进行可视化呈现 (见图 4),包括代谢通路、PI3K/AKT 信号通路、癌症通路和脂质与动脉粥样硬化等。值得注意的是,磷脂酰肌醇 4,5-二磷酸 3-激酶催化亚基 α (phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha, PIK3CA)、磷脂酰肌醇 4,5-二磷酸 3-激酶催化亚基 β (phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit beta, PIK3CB)、PTGS2、AKT1、雷帕霉素靶蛋白 (mechanistic target of rapamycin, mTOR) 和 B 细胞淋巴瘤 2 凋亡调节蛋白 (B-cell lymphoma 2, BCL2) 等关键调控因子在多个通路中呈现交叉富集特征,提示其病理进程涉及多靶点协同调控与跨通路交互作用。

2.1.6 CGE 活性成分-靶点-信号通路网络构建及网络中心性分析

为进一步探究 CGE 干预高脂血症作用机制中

活性成分、作用靶点与信号通路之间的相互作用关系,将关键降血脂药效成分、高脂血症靶点和排行前 10 条 KEGG 富集信号通路运用利用 Cytoscape 3.10.0 软件构建“成分-疾病-通路”相互作用网络图 (见图 5)。20 个 CGE 活性成分通过 140 个潜在作用靶点及排名前 10 的相关信号通路协同作用,从而发挥治疗高脂血症的作用。通过度值、介度中心性、紧密度中心性筛选出 Degree 值较高的活性成分,包括柚皮素、异橙黄酮、芹菜素、三甲基芹菜素、甜橙黄酮、桔皮素和野漆树苷,可将其视为分子对接时的重点验证对象。

2.1.7 CGE 活性成分与关键靶基因的分子对接验证

根据上述网络药理学分析,选取 5 个关键靶点 (PTGS2、ESR1、CASP3、AKT1、TNF) 进行分子对接,并对接能量较优的 CGE 活性成分与靶点 (见表 2) 进行可视化分析 (见图 6)。结果显示,化合物与关键靶点之间形成的氢键长度均在 0.1 ~ 0.3 nm 范围内^[15],表明氨基酸残基与化合物之间的氢键作用距离较短,结合较为紧密,表明两者具有较强的相互作用能力。

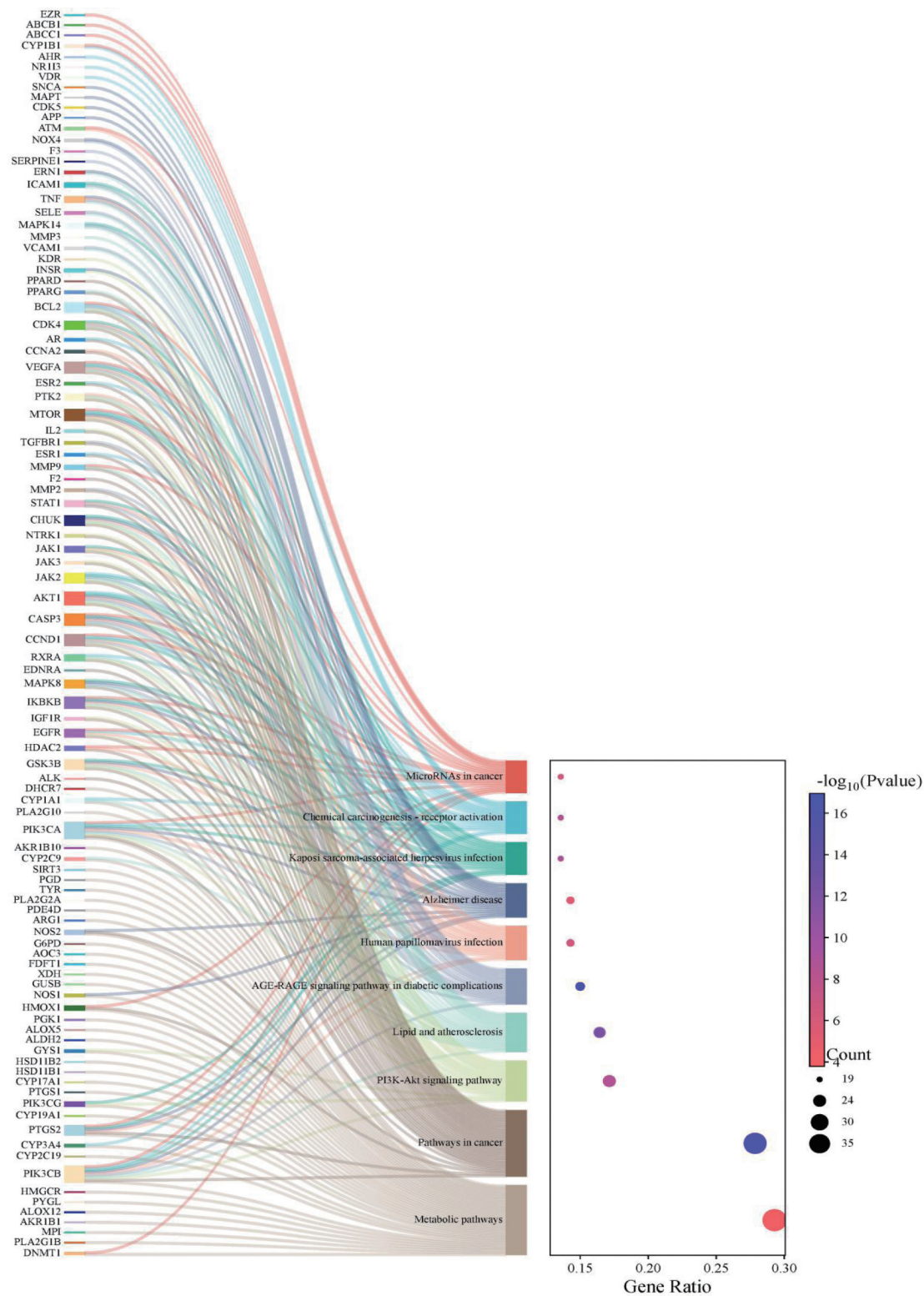


图4 CGE 治疗高脂血症潜在靶点的富集分析桑基气泡图

Fig. 4 Sankey bubble plot of enrichment analysis for potential targets of CGE against hyperlipidemia

注:桑基图中左侧矩形节点代表治疗靶点;右侧矩形节点代表 KEGG 通路;连线表示靶点与通路之间的从属关系。Note: In the Sankey diagram, the rectangular nodes on the left represent the therapeutic targets; The rectangular nodes on the right represent the KEGG pathways; The lines indicate the subordinate relationship between the targets and the pathways.

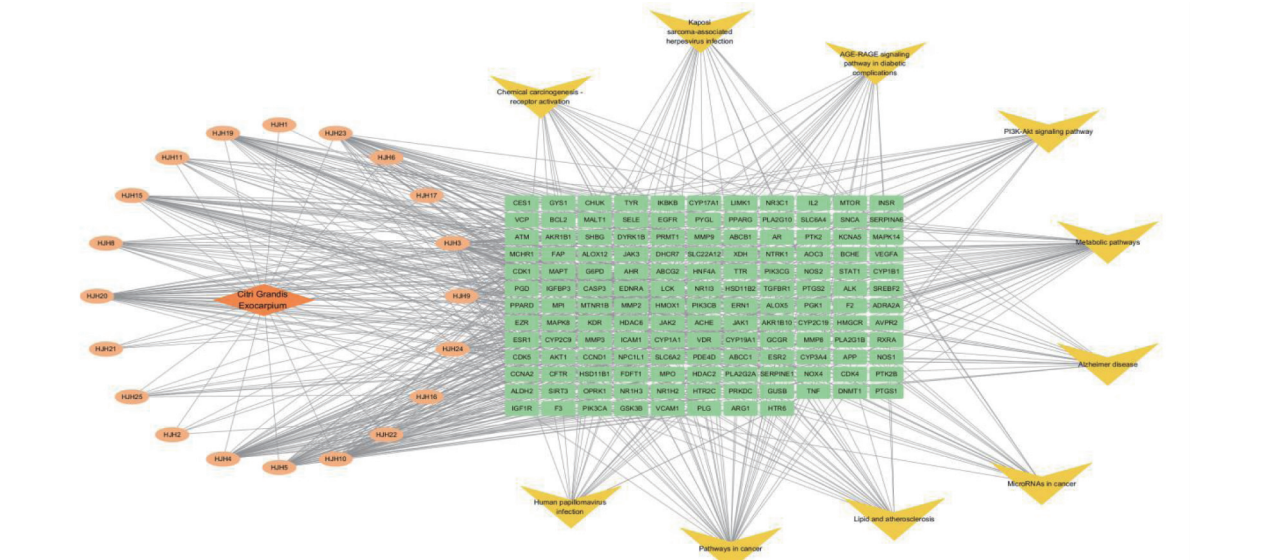


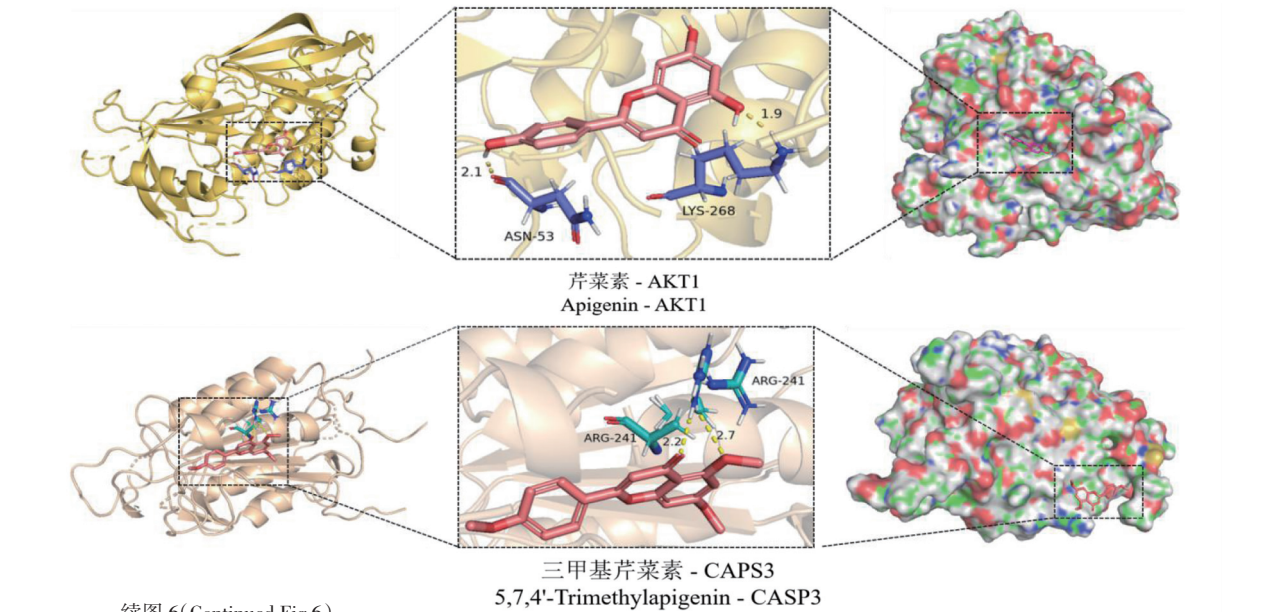
图 5 CGE 活性成分-靶点-信号通路网络图

Fig. 5 Active ingredient of Citri Grandis Exocarpium-target-signaling pathway network diagram

注:图中粉色椭圆形表示 CGE 活性成分;绿色矩形表示作用靶点;黄色四边行形表示活性成分发挥治疗高脂血症靶点作用涉及的信号通路;图中连线表示各节点之间的互动关系和强度。Note:The pink ellipses represent the active components of CGE;The green rectangles represent the targets;The yellow quadrilaterals represent the signaling pathways involved in the therapeutic effects of active components against hyperlipidemia; The connecting lines indicate the interactions and their strengths among the nodes.

表 2 CGE 活性成分与关键靶点分子对接的结合能及相互作用残基

核心靶点 Core target	活性成分 Active component	结合能 Binding energy (kcal/mol)	结合残基 Binding residues
CASP3	柚皮素 Naringenin	-6.50	Met39、Tyr274、Leu278、Leu33
	三甲基芹菜素 5,7,4'-Trimethylapigenin	-5.42	Lys268
AKT1	芹菜素 Apigenin	-6.15	Asn53、Lys268
	三甲基芹菜素 5,7,4'-Trimethylapigenin	-5.99	Arg241



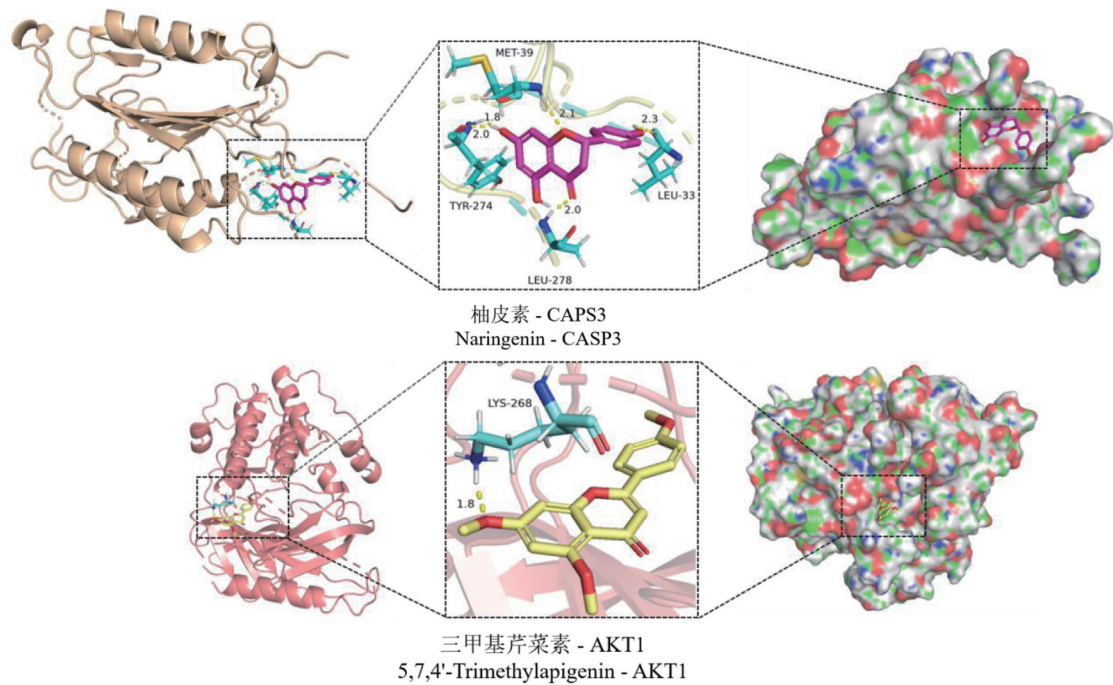


图6 CGE 活性成分与关键靶点分子对接结果可视化图

Fig. 6 Visualization of molecular docking interactions between CGE active components and key targets

2.2 体外实验验证 CGE 降血脂作用

2.2.1 CGE 对 HepG2 细胞活力影响

为探究不同浓度的 CGE 对 HepG2 细胞活力的毒性影响,通过设置 0.1~20 mg/L 多个梯度浓度发现,给药时间为 24 h 时,给药浓度 0.1~2 mg/mL 对细胞活率无明显影响;给药时间为 48 h 时,给药浓度与细胞活率呈负相关,给药浓度 5~20 mg/mL 对细胞有毒害作用(见图 7)。因此筛选出 CGE 给药浓度低剂量为 0.5 mg/mL,中剂量为 1 mg/mL,高剂量为 2 mg/mL。

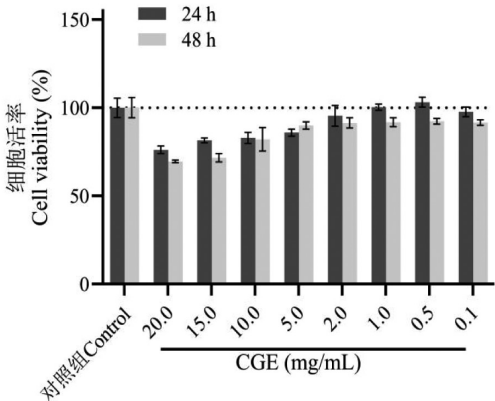


图7 CGE 对 HepG2 细胞活力的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

Fig. 7 Effect of CGE on the viability of HepG2 cells ($\bar{x} \pm s, n=6$)

2.2.2 油酸对 HepG2 细胞活力影响

为探究不同浓度的油酸对 HepG2 细胞活力的毒性影响,当油酸浓度为 0.05~0.2 mmol/L 时,对细胞毒性影响较小(见图 8),因此选择 0.2 mmol/L 油酸作为造模剂浓度。

2.2.3 细胞油红 O 染色结果

本实验通过油红 O 染色可观察到药物对细胞

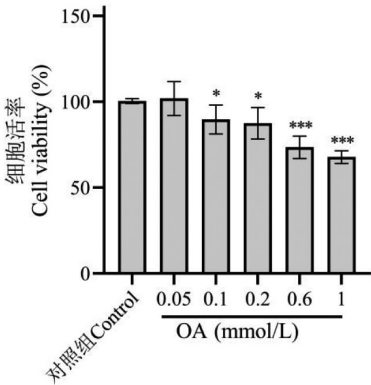


图8 不同浓度油酸对 HepG2 细胞活力的影响($\bar{x} \pm s, n=5$)

Fig. 8 Effect of different concentrations of oleic acid on the viability of HepG2 cells($\bar{x} \pm s, n=5$)

注:OA 表示油酸;与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$,下同。Note: OA stands for oleic acid; Compared with the control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$,the same below.

内脂质沉积有显著的减少作用,模型组中 HepG2 细胞中可见大量橙红色脂滴弥漫分布于胞浆内,而药物处理组 HepG2 细胞中脂滴数量、密度分布显著减少(见图 9)。各组随机选择 5 个染色区域,使用 ImageJ 进行半定量分析,对照组中阳性面积百分比为 39.89%;药物处理组阳性面积百分比下降至 19.4%~23.92%。

2.2.4 CGE 对油酸诱导 HepG2 细胞内 TG 和 TC 含量的影响

检测结果显示,与对照组相比,模型组 HepG2 细胞中的 TG 含量与 TC 含量明显增高,经 CGE 干预后,细胞中的 TG 含量与 TC 含量明显降低。当给药浓度为 1 mg/mL 时,其 TG 含量水平与正常细胞相近;在 2 mg/mL 时,其 TG 与 TC 含量水平均低于正常细胞水平,说明有剂量依赖性(见图 10)。表明 CGE 能有效干预 HepG2 细胞脂代谢过程,抑制细胞

脂质合成,降低细胞内脂质堆积,其作用机制可能与肝脏细胞中的脂质合成、分解过程有关。

2.2.5 CGE 对 HepG2 细胞 AMPK、p-AKT、SREBP-1 蛋白表达水平的影响

根据网络药理学预测结果,重要靶点 AKT1 和 PTGS2 主要富集于脂质代谢相关通路,其中以代谢信号通路和 PI3K/AKT 信号通路为主。结果显示(见图 11),模型组在油酸诱导的高脂环境下,AMPK 表达水平降低($P < 0.001$),而 p-AKT 和 SREBP-1 表达水平均有所升高($P < 0.001$)。在 AICAR 组中,AMPK 表达显著上调($P < 0.001$),p-AKT 和 SREBP-1 表达则呈现不同程度下降($P < 0.001$)。在 CGE 治疗组中,随着药物浓度增加,AMPK 表达水平逐渐升高($P < 0.01$),p-AKT 和 SREBP-1 表达水平有降低趋势($P < 0.001$),表现出明显的剂量依赖性。

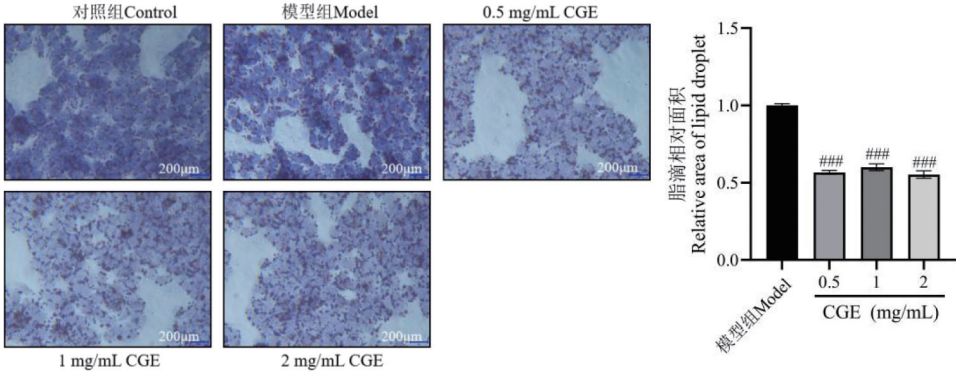


图 9 CGE 对 HepG2 细胞脂滴沉积的影响($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Fig. 9 Effect of CGE on lipid accumulation in HepG2 cells ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

注:与模型组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$,下同。Note: Compared with the model group, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$, the same below.

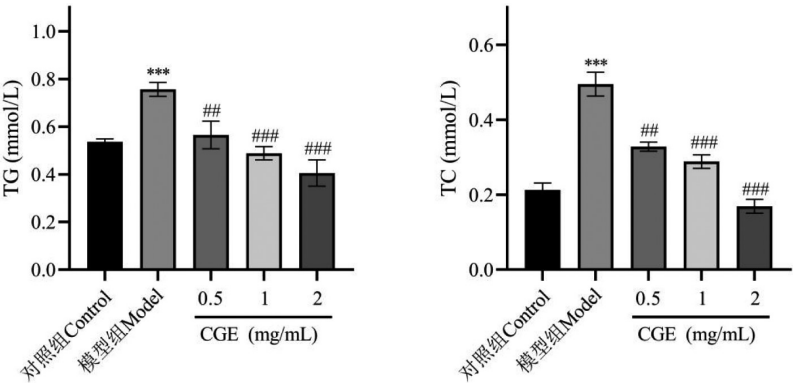


图 10 CGE 对 HepG2 细胞内 TG 和 TC 含量的影响($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 10 Effect of CGE on TG and TC levels in HepG2 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

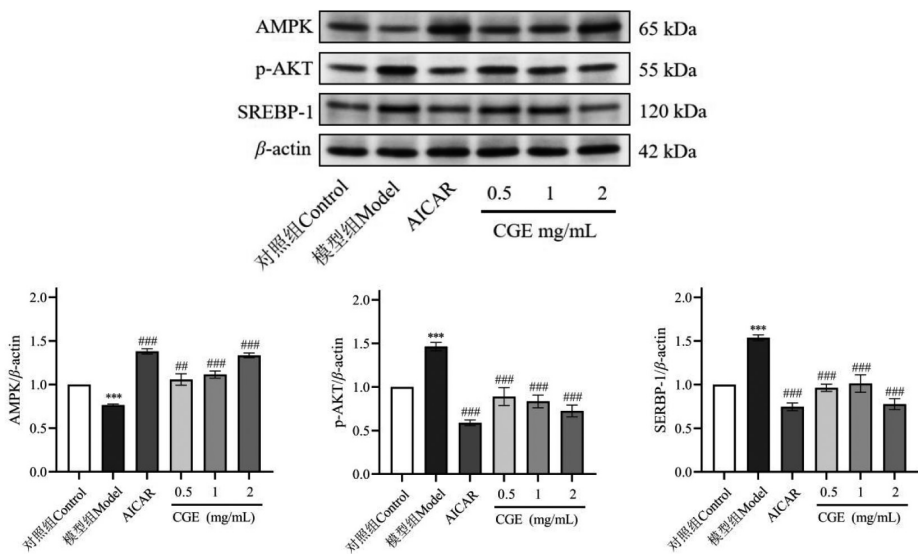


图 11 CGE 对油酸诱导的 HepG2 脂肪变性细胞中蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 11 Effects of CGE on protein expression in oleic acid-induced steatotic HepG2 cells($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3 讨论与结论

中药有多成分、多靶点、多作用通路、“标本兼治”的特点,现代药理学研究表明,CGE 及其化学成分具有止咳、平喘、降血糖、降血脂、抗氧化、抗炎、免疫调节等药理活性^[16]。但对于降血脂的研究尚较少,其治疗机理尚不明确。近年来,CGE 的多种药理功效逐渐被挖掘和证实,CGE 被认为可以干预高脂血症。本研究采用网络药理学和分子对接技术,初步揭示 CGE 活性成分干预高脂血症的潜在作用机制。

利用 TCMSP 等数据库,筛选获得 20 个 CGE 活性成分和 140 个治疗高脂血症的潜在靶点。基于相互作用网络图筛选发现 CGE 中发挥降脂作用的主要活性成分为柚皮素、异橙黄酮和芹菜素等。其中,柚皮素、芹菜素具有抗氧化、促进脂质代谢等特性^[17,18]已有文献报道。由此可知,CGE 的降脂作用可能由多活性成分、多靶点发挥协同作用。

将 140 个关键靶点进行 GO 和 KEGG 富集分析,发现 CGE 活性成分治疗高脂血症的靶点参与众多生命进程,主要涉及细胞组成、细胞间信号调控、分子间相互结合等。KEGG 信号通路主要注释到代谢通路、PI3K/AKT 信号通路、癌症通路和脂质与动脉粥样硬化等。肝脏脂质代谢受到一个复杂分子网络的调控,受固醇调节元件结合蛋白 1 (SREBP-1) 等以及 PI3K/AKT 和 AMPK 信号通路调控^[19]。AKT 信号通路被证实是调控脂肪生成的核心分子

枢纽^[20]。有功能研究显示,跨膜糖蛋白 CD147 通过激活 PI3K/AKT 信号通路,特异性上调脂肪生成关键调控因子 SREBP-1c 及其下游靶点 ACC1 的表达水平^[21]。PI3K 信号传导是细胞生长、存活和代谢的关键调节中心,PI3K/AKT 信号通路在肝脏代谢过程中有重要影响^[22],该信号通路不仅在脂质代谢中起着重要的调节作用,而且在葡萄糖代谢过程中也起着重要的调节作用。此外,磷酸化 AKT1 通过激活雷帕霉素靶蛋白 (mechanistic target of rapamycin, mTOR) 信号轴,进而增强 SREBP-1 的活性,最终促进细胞内 TG 蓄积;抑制 AKT-mTOR 信号可显著下调脂生成相关基因表达,起到调节脂肪酸合成的作用^[23]。值得注意的是,AKT1 作为 CGE 作用的关键靶基因,此结果与相关靶点所具有的功能相一致。

AMPK 在激活乙酰辅酶 A 羧化酶 (acetyl-CoA carboxylase, ACC) 和抑制 SREBP-1 表达来调节脂质代谢和炎症中起着关键作用,同时减少肝脏脂肪积累^[24]。有研究称 AMPK 的激活可以抑制固醇调节元件结合蛋白家族的表达,并抑制 ACC1 的活性^[25],进而减少脂肪酸和胆固醇的合成。AMPK 和 mTORC1 可以相互抑制彼此的活性以保持平衡。一方面,AMPK 通过结节性硬化复合物 2 和 mTOR 调节相关蛋白的磷酸化抑制雷帕霉素靶蛋白复合物 1 (mechanistic target of rapamycin complex 1, mTORC1) 的活性;另一方面, mTORC1 通过磷酸化

AMPK α 1 上保守的丝氨酸残基 (Ser347) 直接抑制 AMPK 活性^[26]。由此可知, PI3K/AKT 和 AMPK-mTOR 信号通路与脂质的积累密不可分, 同样直接或间接地证明高脂血症的发生与该信号通路有着重要联系, 故 Western blot 实验聚焦 PI3K/AKT 和 AMPK 信号通路进行验证。

综上, 本研究通过网络药理学与分子对接技术预测了 CGE 活性成分干预高脂血症的关键途径, 得到了柚皮素、异橙黄酮和芹菜素等 20 种 CGE 主要活性成分, 获得了 CASP3、PTGS2 和 AKT1 等 CGE 治疗高脂血症的关键靶点, 通过代谢通路和 PI3K/AKT 信号通路等起到干预高脂血症的作用。另外, 通过体外实验研究了 CGE 对 HepG2 细胞脂质代谢的影响, 结果显示 CGE 能显著减少脂质沉积; 通过油红 O 和苏木素染色观察到, 与模型组 (脂质沉积严重, 阳性面积达 39.89%) 相比, CGE 治疗组能极显著地减少细胞内的脂滴数量和分布, 使阳性面积百分比下降至 19.4% ~ 23.92%。此外, CGE 还能有效降低细胞脂质沉积模型中异常升高的 TG 和 TC 水平。在 1 mg/mL 浓度下, TG 含量可恢复至接近正常水平; 在 2 mg/mL 时甚至能使 TG 和 TC 含量低于正常细胞, 且其效果呈现剂量依赖性。Western blot 对网络药理学预测验证结果显示, CGE 通过上调 AMPK ($P < 0.001$) 表达并下调 p-AKT 与 SREBP-1 ($P < 0.01$), 激活了细胞的能量感应通路, 同时抑制了促进生存与增殖的 PI3K/AKT 信号, 进而阻断脂质合成的转录程序, 最终减少脂质堆积。实验结果表明, CGE 是一种潜在的降脂药物, 它通过有效干预 HepG2 细胞的脂代谢过程, 抑制脂质合成, 从而降低细胞内脂质堆积, 其作用机制可能与调控肝脏细胞的脂质合成与分解有关。本研究为 CGE 的深入机制研究和未来天然药物开发奠定了一定基础, 不足的是网络药理学预测结果尚未在动物实验或临床验证; CGE 成分复杂, 关键药效成分及相互作用还不明确。后续研究应建立动物模型以确认其降脂效果与安全性, 明确 CGE 中主要降脂成分及其协同作用, 并拓展其对脂质吸收、氧化等其他代谢环节的影响。

数据可用性声明: 本篇论文的关联数据可在 ScienceDB 数据库 (<https://doi.org/10.57760/sciencedb.nprd.00074>) 中访问获取。

参考文献

1 Taddei C, Zhou B, Bixby H, et al. Repositioning of the global

- epicentre of non-optimal cholesterol [J]. *Nature*, 2020, 582: 73-77.
- 2 GBD 2017 DALYs Collaborators. Global, regional, and national disability-adjusted life-years (DALYs) for 359 diseases and injuries and healthy life expectancy (HALE) for 195 countries and territories, 1990 - 2017: a systematic analysis for the global burden of disease study 2017 [J]. *Lancet*, 2018, 392: 1859-1922.
- 3 Deng XJ, Hou Y, Zhou HJ, et al. Hypolipidemic, antiinflammatory, and anti-atherosclerotic effects of tea before and after microbial fermentation [J]. *Food Sci Nutr*, 2021, 9: 1160-1170.
- 4 Hlatky MA, Kazi DS. PCSK9 inhibitors: economics and policy [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2017, 70: 2677-2687.
- 5 Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China: Vol I (中华人民共和国药典: 第一部) [M]. Beijing: China Medical Science Press, 2020: 76-77.
- 6 Yin MX, Hu CL, Huang J, et al. Research progress on flavonoids in Citri Grandis Exocarpium [J]. *World Latest Med Inf*, 2017, 17: 69-70.
- 7 Chen Z, Zhang JN, Chen WT, et al. Simultaneous determination of three PXR-CYP3A4-regulating lipid-lowering components in Citri Grandis Exocarpium by UHPLC-MS/MS [J]. *J Liaoning Univ Tradit Chin Med* (辽宁中医药大学学报), 2020, 22: 54-58.
- 8 Wu G, Wei X, Li D, et al. Selection and evaluation of quality markers for the regulation of PXR-CYP3A4/FXR-LXR α by Exocarpium Citri Grandis for the treatment of hyperlipidaemia with dispelling blood stasis and removing phlegm [J]. *Biomed Pharmacother*, 2024, 170: 116089.
- 9 Zhang SX, Zhang XL, Lu S, et al. Protective effect of naringin on alcohol-induced acute liver injury [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form* (中国实验方剂学杂志), 2023, 29: 61-66.
- 10 Zang BB, Li H, Yang Y, et al. Naringin ameliorates lipopolysaccharide-induced liver injury by inhibiting pyroptosis of kupffer cells [J]. *Mod Tradit Chin Med Mater Med World Sci Technol* (世界科学技术-中医药现代化), 2023, 25: 1122-1132.
- 11 Ma YX, Song Q, Zhang J, et al. Effect of taurine on triglyceride synthesis in HepG2 cells [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2020, 32: 867-873.
- 12 Wang XL. Effect of monascus yellow pigment on oleic acid-induced lipid accumulation in HepG2 cells [D]. Tianjin: Tianjin University of Science and Technology (天津科技大学), 2020.