

DOI: 10.20135/j.issn.1006-8147.2025.01.0001

论著

基于网络药理学、分子对接技术及细胞实验探究柚皮苷二氢查尔酮在动脉粥样硬化治疗中的分子机制

范丽文¹, 张宇凡², 李娇², 魏丽萍²

(1.天津医科大学研究生院, 天津 300070; 2.天津市人民医院心血管内科, 天津 300121)

摘要 **目的:**利用网络药理学、分子对接技术及细胞实验探究柚皮苷二氢查尔酮在动脉粥样硬化(AS)治疗中的作用靶点和分子机制。**方法:**通过 GeneCards、TTD、OMIM 和 Swiss Target Prediction 等数据库获得 AS 和柚皮苷二氢查尔酮的潜在靶点,利用韦恩图确定二者的共同靶点,导入 STRING 在线平台形成蛋白互作(PPI)网络关系图,利用 Cytoscape 3.8.2 软件生成核心交集靶点图,同时将核心靶点输入 DAVID 数据库进行 GO 和 KEGG 通路富集分析,利用 AutoDock4.2.6 软件对药物及核心靶点进行分子对接验证。最后,选用人脐静脉内皮细胞,通过 H₂O₂ 诱导建立 AS 氧化应激细胞模型进行体外生物学验证。**结果:**经过检索获得 2 044 个 AS 相关疾病靶点和 100 个柚皮苷二氢查尔酮作用靶点。韦恩图筛选获得 38 个交集靶点。PPI 网络分析得到 10 个核心靶点,按 MCC 评分依次为 *EGFR*、*CASP3*、*ESR1*、*MTOR*、*FN1*、*MMP9*、*PARP1*、*PIK3CA*、*CTSD*、*CDK2*。通过 GO 和 KEGG 通路分析显示这些靶点主要涉及炎症、PI3K/Akt 信号通路和细胞程序性死亡的信号途径等。分子对接分析结果显示,柚皮苷二氢查尔酮和多个核心靶点具有良好的结合效能。细胞实验显示,与 Control 组相比,H₂O₂ 组细胞内活性氧簇(ROS)和 Cleaved caspase-3 的表达水平升高($F=17.77$ 、 73.31 , 均 $P<0.001$),核因子 κ B(NF- κ B) p65、基质金属蛋白酶 9(MMP-9)和肿瘤坏死因子- α (TNF- α)蛋白的表达上调明显($F=22.65$ 、 18.64 、 9.97 , 均 $P<0.05$)。与 H₂O₂ 组相比,高浓度的柚皮苷二氢查尔酮能抑制细胞内的 ROS ($P<0.01$)及剪切胱天蛋白酶 3(Cleaved caspase-3)的表达升高($P<0.001$),抑制 NF- κ B p65 激活($P<0.01$)以及下调 MMP-9 和 TNF- α 蛋白的表达(均 $P<0.01$)。**结论:**柚皮苷二氢查尔酮可通过多靶点、多途径发挥治疗 AS 的作用。

关键词 柚皮苷二氢查尔酮;动脉粥样硬化;网络药理学;分子对接;细胞实验

中图分类号 R543

文献标志码 A

文章编号 1006-8147(2025)01-0001-09

Exploring the molecular mechanism of naringin dihydrochalcone intervention in atherosclerosis based on network pharmacology, molecular docking and cell experiments

FAN Liwen¹, ZHANG Yufan², LI Jiao², WEI Liping²

(1. Graduate School, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China; 2. Department of Cardiovascular Medicine, Tianjin People's Hospital, Tianjin 300122, China)

Abstract **Objective:** To explore the target and molecular mechanism of naringin dihydrochalcone in the treatment of atherosclerosis using network pharmacology, molecular docking techniques and cell experiments. **Methods:** The potential targets of AS and naringin dihydrochalcone were obtained through databases such as GeneCards, TTD, OMIM, and Swiss Target Prediction. A Venn diagram was utilized to identify the common targets of the two compounds. Subsequently, these targets were imported into the STRING online platform to construct a protein-protein interaction (PPI) network diagram. The core intersecting target map was generated using Cytoscape 3.8.2 software. Additionally, the core targets were inputted into the DAVID database for Gene Ontology (GO) and KEGG pathway enrichment analysis. Molecular docking validation of the drug and core targets was performed using AutoDock 4.2.6 software. Finally, human umbilical vein endothelial cells were selected to establish an oxidative stress cell model induced by H₂O₂ for *in vitro* biological validation of AS. **Results:** Through retrieval, 2 044 disease targets related to AS and 100 action targets of naringin dihydrochalcone were obtained. The Venn diagram screening yielded 38 intersection targets. The PPI network analysis identified 10 core targets, ranked by MCC score as follows: *EGFR*, *CASP3*, *ESR1*, *MTOR*, *FN1*, *MMP9*, *PARP1*, *PIK3CA*, *CTSD*, and *CDK2*. The analyses of GO and KEGG pathways indicated that these targets were mainly involved in inflammation, the PI3K/Akt signaling pathway, and the signaling pathways of programmed cell death, etc. The results of molecular docking analysis demonstrated that naringin dihydrochalcone had favorable binding efficacy with multiple core targets. Cell experiments revealed that compared with the Control group, the expression levels of reactive oxygen species (ROS) and Cleaved caspase-3 in the H₂O₂ group increased ($F=17.77$, 73.31 , both $P<0.001$), and the expressions of NF- κ B p65, MMP-9, and TNF- α proteins were significantly upregulated ($F=22.65$, 18.64 , 9.97 , all $P<0.05$). Compared with the H₂O₂ group, high concentrations of naringin dihydrochalcone could inhibit the intracellular ROS ($P<0.01$) and the increased expression of Cleaved

基金项目 天津市卫生健康科技项目(TJWJ2022QN037);天津市人民医院重点课题(2023YJZD003)

作者简介 范丽文(1999-),女,硕士在读,研究方向:动脉粥样硬化发生机制、纳米材料应用;通信作者:魏丽萍,E-mail:weilipingme@163.com。

caspase-3 ($P<0.001$), inhibit the activation of NF- κ B p65 ($P<0.01$), and downregulate the expressions of MMP-9 and TNF- α proteins ($P<0.01$). **Conclusion:** Naringin dihydrochalcone can play a role in the treatment of AS through multiple targets and multiple pathways.

Key words naringin dihydrochalcone; atherosclerosis; network pharmacology; molecular docking; cell experiments

动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)是一种慢性炎症性血管疾病,以动脉管壁渐进性增厚、斑块形成、管腔狭窄和斑块破裂出血为特征^[1]。AS可引起多种心血管相关并发症,如血栓形成、缺血和心绞痛^[2]。因此,防治AS有重大意义。大多数AS患者接受他汀类等的降脂药物的治疗,然而他汀类药物已被证实有许多不可避免的不良反应,其经过肝脏代谢,会引起血清谷丙转氨酶升高,并且部分患者会出现肌肉疼痛的症状,导致停用他汀类药物^[3]。因此,如何防治AS疾病的发生与发展,填补传统药物在治疗中的空白,是目前仍待解决的难题。

天然药物具有结构多样、活性好、不良反应小的特点,寻找安全有效的天然药物已逐渐成为当前的研究热点,其中黄酮类等天然产物被认为具有明显的抗氧化作用。柚皮苷是一种黄酮类化合物,可从西红柿、柑橘、柚子中提取^[4]。药理作用研究表明,其具有抑制炎症、抗氧化、抗细胞凋亡等功效^[5]。柚皮苷具有抑制AS的作用,可明显抑制氧化低密度脂蛋白诱导的细胞损伤和细胞凋亡,且呈浓度依赖性^[6]。二氢查尔酮具有多种生理药理活性,2,6-二羟基苯乙酮是二氢查尔酮关键的药效基团,具有抗氧化作用,可通过清除过氧化物和羟自由基来实现^[7]。柚皮苷二氢查尔酮通过柚皮苷氢化获得^[8],Choi等^[9]研究证实柚皮苷二氢查尔酮能有效抑制过氧化氢和次氯酸,显著清除活性氧簇(ROS)和自由基,从而抑制蛋白质降解和DNA链断裂,这说明柚皮苷二氢查尔酮具有治疗AS相关疾病的潜力。并且柚皮苷二氢查尔酮还能降低动物体内的胆固醇含量,这对预防AS具有重大意义^[10]。然而,以往的研究并未深入探讨柚皮苷二氢查尔酮抑制AS的具体机制。因此,本研究通过网络药理学以及分子对接技术,探究柚皮苷二氢查尔酮对AS的潜在治疗作用靶点及信号通路,同时,通过细胞实验验证探讨柚皮苷二氢查尔酮防治AS的作用机制,进一步为柚皮苷二氢查尔酮作为AS潜在治疗药物的开发提供新的理论依据和研究方向。

1 材料和方法

1.1 网络药理学及分子对接分析

1.1.1 疾病相关靶点的筛选 以“Atherosclerosis”为关键词,利用数据库 Gene Cards (<http://www.genecards.org/>)、TTD (<https://db.idrblab.net/ttd/>)以及

药物靶标数据库 DisGeNET (<http://www.disgenet.org/web/DisGeNET/menu>)和在线人类孟德尔遗传数据库 OMIM (<https://www.omim.org/>)检索AS的相关靶基因,“Organism”选择“Homo sapiens”的情况下,结合查询到的所有关键靶点并去除重复后,最终获得了与AS有关的靶基因。

1.1.2 柚皮苷二氢查尔酮潜在作用靶点的预测 柚皮苷二氢查尔酮的二维和三维化学结构通过PubChem (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/home/chemicals>)数据库获得。将其上传至 Swiss Target Prediction 数据库 (<http://www.swisstargetprediction.ch/>),在该界面中“Organism”选择“Homo sapiens”,获得柚皮苷二氢查尔酮的预测靶基因。将其与1.1.1部分获取的疾病靶基因一同上传至在线作图工具 (<http://jvenn.toulouse.inra.fr/app/example.html>),得到交集靶点并绘制韦恩图。

1.1.3 蛋白质互作(PPI)网络图构建及关键靶点的筛选 利用 STRING (<https://stringdb.org/>)在线平台对1.1.2步骤利用韦恩图筛选出的共同靶点进行可视化分析和整理,建立展现药物对疾病靶点影响的PPI网络图,揭示柚皮苷二氢查尔酮靶点蛋白与AS靶点蛋白之间的交互作用。为了进一步清晰呈现PPI网络细节,将图输入到 Cytoscape 3.8.2 软件程序中进行图形化处理。利用 Cytohubba 插件评估基因的核心度,选取马修斯相关系数(MCC)评分前10的基因作为关键靶点,得到PPI网络的核心功能模块区域。

1.1.4 GO和KEGG通路富集分析 将1.1.2步骤中得到的柚皮苷二氢查尔酮与AS的共同靶基因通过导入 DAVID 数据库进行了GO基因本体论分析。选择如下3个参数:生物过程(BP)、细胞成分(CC)、分子功能(MF)对基因进行GO富集分析。利用京都基因与基因组百科全书(KEGG)对于药物和疾病的交集靶点进行通路的富集分析。在分析结果中,筛选出GO富集度和KEGG富集度排名前10的进行可视化分析处理。

1.1.5 分子对接分析及可视化 分子对接经常应用于新药研发,是一种研究受体-配体相互识别和作用的药物设计技术。将柚皮苷二氢查尔酮与PPI网络中关键靶点蛋白进行分子对接,首先建立药物配体和靶点蛋白受体的结构文件;接着依托 PyMOL

软件进行编辑,如脱水及加氢等步骤;然后利用 AutoDock4.2.6 软件进行分子层面的拟合对接分析,评估和验证柚皮苷二氢查尔酮和核心靶点之间的亲和力以及结合模式,并通过结合能的计算来评价其结合活性。当结合能 <-5 kcal/mol 时,表示药物与靶基因结合力良好,亲和力高,以此作为筛选标准。最后根据对接结果,绘制结合模式图,并应用 Lig-Plus 软件进行对接模式的可视化处理展示。

1.2 细胞实验

1.2.1 细胞、药品与试剂 人脐静脉内皮细胞(HUVEC)购自中国科学院上海细胞研究所;柚皮苷二氢查尔酮购自上海毕得医药科技股份有限公司;30% H_2O_2 购自西格玛奥德里奇(Sigma-Aldrich, 上海);CCK-8 试剂盒、活性氧检测试剂盒和 BCA 蛋白定量试剂盒由上海碧云天公司提供;核因子 κB (NF- κB) p65 一抗、基质金属蛋白酶-9(MMP-9)一抗、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)一抗、剪切胱天蛋白酶 3(Cleaved caspase-3)一抗、微管蛋白(β -tubulin)一抗及二抗均由美国 Abcam 公司供应。

1.2.2 CCK-8 法检测细胞活力 将 HUVEC 培养于 $37^\circ C$ 、5% CO_2 培养箱内,使用含 10%胎牛血清和 1%青霉素-链霉素的培养基,按照 1×10^5 /mL 的密度接种至 96 孔板。细胞贴壁后,加入不同浓度的药物培养基进行孵育。到达预定时间后,每孔加入 100 μL CCK-8 工作液,孵育 2 h 后,在 450 nm 处测定吸光度,计算细胞存活率。为评估柚皮苷二氢查尔酮对细胞活力的影响,采用梯度稀释法将其终浓度设为 0、5、10、20、50、100 和 200 $\mu mol/L$,孵育 24 h 后,弃药物培养基并加入 CCK-8 工作液孵育 2 h。为检测柚皮苷二氢查尔酮的细胞保护作用,预先加入不同浓度的柚皮苷二氢查尔酮(10、50、100、200 $\mu mol/L$)孵育 2 h,再加入 400 $\mu mol/L$ H_2O_2 刺激 12 h,之后加入 CCK-8 工作液孵育 2 h,最后通过酶标仪在 450 nm 处测定吸光度。

1.2.3 ROS 的检测 将 HUVEC 以 2×10^5 /mL 接种于共聚焦培养皿中,随机分为 Control 组、 H_2O_2 组、低剂量(L)组、高剂量(H)组。L 组和 H 组分别加入 50 $\mu mol/L$ 、100 $\mu mol/L$ 的柚皮苷二氢查尔酮预处理细胞 2 h 后,用 400 $\mu mol/L$ H_2O_2 刺激细胞 12 h,Control 组用新鲜培养基处理, H_2O_2 组加入 400 $\mu mol/L$ H_2O_2 刺激处理 12 h。随后,冲洗细胞并用无血清 DMEM 稀释 DCFH-DA 探针(10 $\mu mol/L$)处理 30 min。PBS 洗涤 3 次,通过激光共聚焦显微镜在共聚焦培养皿中观察细胞内 ROS 的生成。

1.2.4 细胞内 Cleaved caspase-3 免疫荧光检测 将

HUVEC 以 2×10^5 /mL 接种于共聚焦培养皿中,按 1.2.3 方法随机分组并处理。后用 PBS 洗涤细胞,4%多聚甲醛固定 20 min,随后加入 Cleaved caspase-3 抗体(1:200)4 $^\circ C$ 孵育过夜。第 2 天,用荧光二抗(1:500)孵育细胞,DAPI 染细胞核,并在激光共聚焦显微镜下拍照。

1.2.5 Western 印迹法检测 NF- κB 通路相关蛋白的表达 将 HUVEC 以 1×10^6 /mL 的密度接种于 6 孔板,按照 1.2.3 方法进行随机分组和处理。收集各组细胞,用 RIPA 裂解液裂解并离心,提取总蛋白,并使用 BCA 试剂盒测定蛋白浓度。等量蛋白样品在 10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶上进行电泳,随后转移到 PVDF 膜并进行封闭。分别加入一抗 β -tubulin、NF- κB p65、MMP-9 和 TNF- α (1:1 000),4 $^\circ C$ 孵育过夜,次日更换二抗(1:5 000),室温孵育 2 h 后显影。实验重复 3 次,使用 Image J 软件进行定量分析。

1.3 统计学处理 采用 GraphPadPrism8.0 进行数据统计分析,所有实验均重复 3 次,符合正态分布的数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组样本均数的比较使用单因素方差分析(One-way-ANOVA), $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

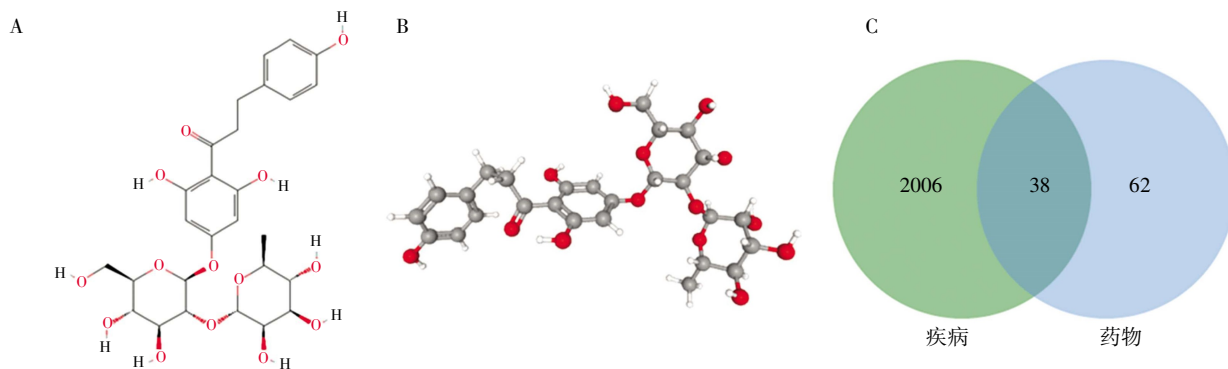
2.1 网络药理学及分子对接结果分析

2.1.1 疾病靶点基因预测结果 通过在 GeneCards 和 DisGeNET、TTD、OMIM 数据库检索 AS 靶点,根据筛选条件去除重复,最终得到 AS 相关基因靶点 2 044 个。

2.1.2 柚皮苷二氢查尔酮相关靶点基因预测结果 通过 Pub Chem 数据库检索,可获得柚皮苷二氢查尔酮的二维及三维化学结构图(图 1A、B)。从 Swiss Target Prediction 数据库通过筛选获得 100 个柚皮苷二氢查尔酮作用靶基因。将 2.1.1 获得的 AS 相关靶基因共同上传至在线作图工具(<http://jvemm.toulouse.inra.fr/app/example.html>)进行韦恩分析后,共得到 38 个柚皮苷二氢查尔酮治疗 AS 的潜在靶点(图 1C)。

2.1.3 PPI 网络的构建与分析 采用 STRING 数据库构建柚皮苷二氢查尔酮与 AS 交集靶点的 PPI 网络(图 2A),并通过 Cytoscape 插件进行 MCC 评分以作筛选,最终获得评分排名前 10 的关键基因如下:EGFR、CASP3、ESR1、MTOR、FNI、MMP9、PARP1、PIK3CA、CTSD、CDK2(图 2B)。

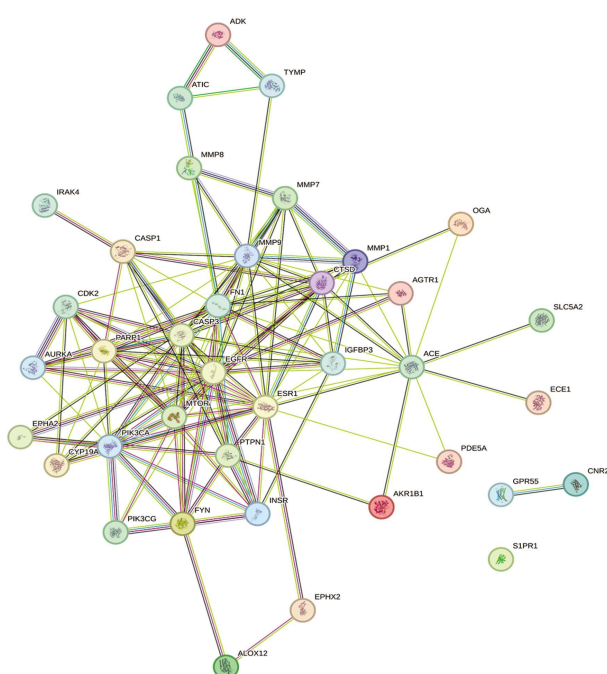
2.1.4 GO 功能分析 将 2.1.2 得到的柚皮苷二氢查尔酮与 AS 的 38 个共同靶基因导入 DAVID 数据库,进行 GO 分析,结果显示柚皮苷二氢查尔酮治疗



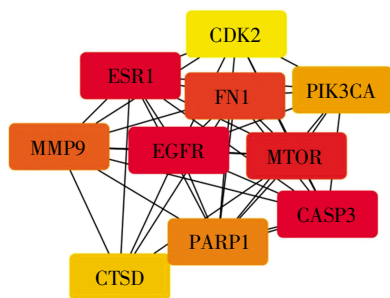
注:A:柚皮苷二氢查尔酮 2D 结构;B:柚皮苷二氢查尔酮 3D 结构;C:柚皮苷二氢查尔酮与 AS 靶点韦恩图;AS:动脉粥样硬化

图 1 柚皮苷二氢查尔酮的结构示意图及与 AS 潜在交集靶点

Fig.1 The schematic diagram of naringin dihydrochalcone's structure and its potential intersection targets in AS



B



注:A:交集靶点 PPI 网络图;B:前 10 个关键靶点 PPI 网络图;

AS:动脉粥样硬化

图 2 柚皮苷二氢查尔酮和 AS 的 10 个交集靶点的 PPI 网络

Fig.2 The PPI network conducted of naringin dihydrochalcone and 10 intersecting targets in atherosclerosis

AS 的潜在靶点被富集,其 BP 主要涉及到蛋白质水解、信号转导、蛋白质磷酸化等(图 3A);CC 涉及质膜、胞膜、胞质基质等(图 3B);MF 涉及 ATP 结合、

相同蛋白结合、蛋白丝氨酸/苏氨酸/酪氨酸激酶的活性等(图 3C)。

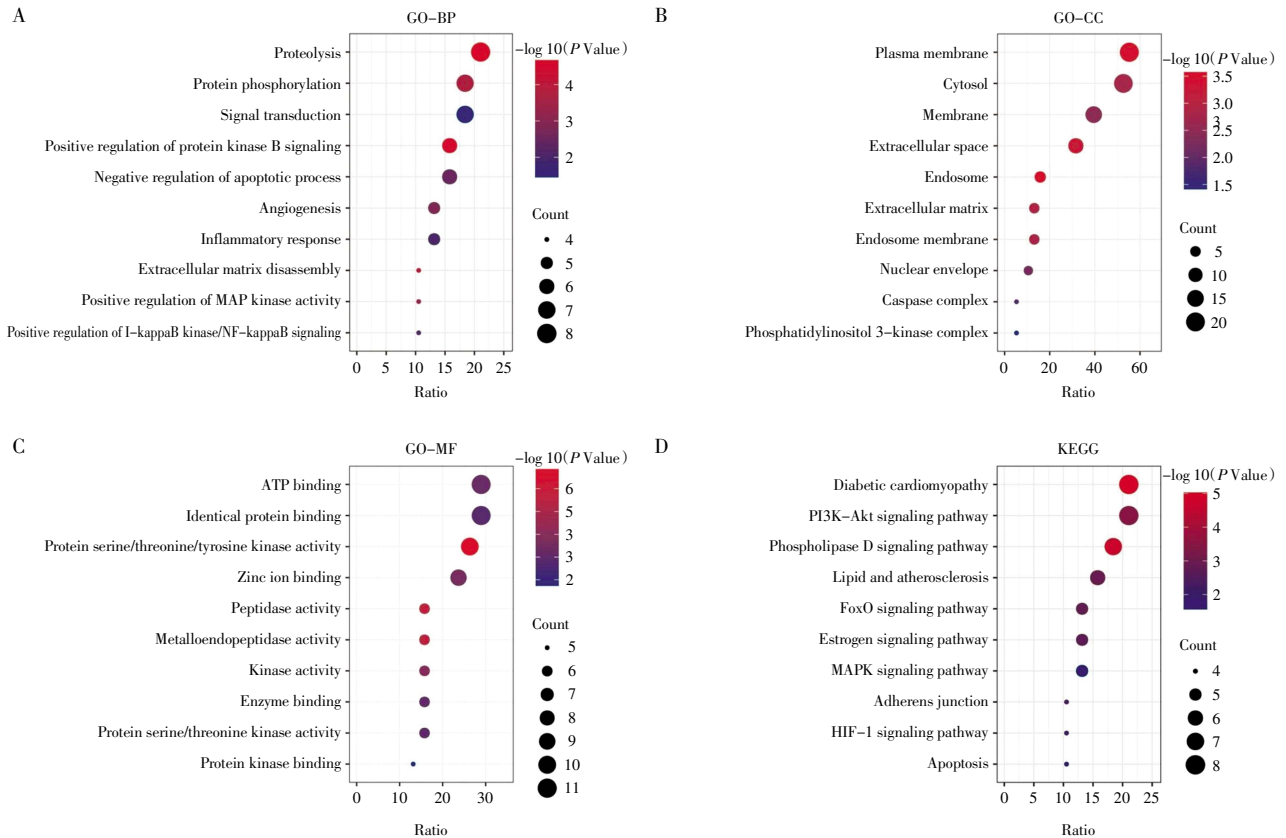
2.1.5 KEGG 通路富集分析 运用 DAVID 数据库对这些共同靶点涉及的通路途径进行了 KEGG 通路富集分析,筛选出相关度富集排名前 10 位的通路,将其进行可视化绘制气泡图。KEGG 分析结果显示,主要涉及的通路有糖尿病心肌病通路、PI3K-Akt 信号通路、脂质和 AS 信号通路、凋亡信号通路等(图 3D)。

2.1.6 分子对接 为了进一步证实靶蛋白和药物中有效成分之间的亲和力,本实验将 PPI 网络中筛选到的 10 个关键靶蛋白和柚皮苷二氢查尔酮的二维构型导入 AutoDock4.2.6 软件进行分子对接,对接结果按结合能数值由高到低进行排序,结果如表 1 所示。利用 PyMOL 和 LigPlus 软件对分子的对接结果实现了可视化,获得柚皮苷二氢查尔酮和 AS 的核心靶点分子对接的二维及三维对接模式图(图 4A、B)。结果表明,柚皮苷二氢查尔酮可与多个靶点良好对接来干预 AS 的进展。

2.2 细胞实验

2.2.1 柚皮苷二氢查尔酮对 HUVEC 细胞活力的影响 结果显示(图 5A),5、10、20、50、100 和 200 $\mu\text{mol/L}$ 的柚皮苷二氢查尔酮对 HUVEC 细胞活力无明显影响,具有良好的生物相容性。图 5B 结果显示,与 Control 组相比, H_2O_2 组中 HUVEC 细胞存活率明显降低($F=11.28, P<0.001$);与 H_2O_2 模型组相比,柚皮苷二氢查尔酮预处理可以增加 H_2O_2 损伤细胞的存活率,且呈浓度依赖性,200 $\mu\text{mol/L}$ 的柚皮苷二氢查尔酮对细胞的保护作用最强($P<0.01$)。

2.2.2 柚皮苷二氢查尔酮能抑制细胞内 ROS 生成 ROS 可以反映细胞内氧化应激的水平,因此利用 DCFH-DA 探针标记细胞内的 ROS, Hoechst 染料标



注:A:GO 生物过程分析;B:GO 细胞组分分析;C:GO 分子功能分析;D:KEGG 富集分析

图 3 PPI 网络中前 10 个关键靶点的 GO 功能和 KEGG 富集分析

Fig.3 GO function and KEGG enrichment analysis of the top 10 key targets in PPI network

表 1 分子对接结合能

Tab.1 Molecular docking binding energy

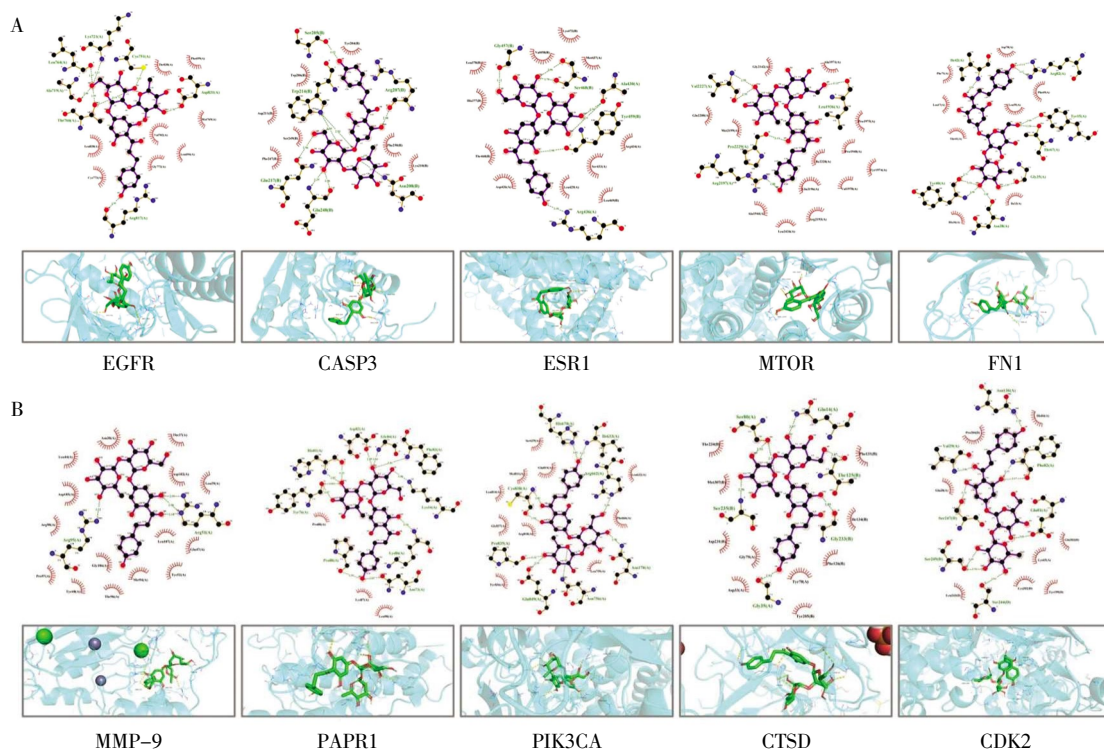
基因名称	对应蛋白名称	结合能(kcal·mol ⁻¹)
MTOR	哺乳动物雷帕霉素靶蛋白	-10.0
PIK3CA	磷脂酰肌醇 4,5-二磷酸 3-激酶催化亚基 α 亚型	-9.1
CTSD	组织蛋白酶 D	-8.9
CDK2	细胞周期蛋白依赖性激酶 2	-8.6
MMP-9	基质金属蛋白酶-9	-8.5
CASP3	半胱天冬酶-3	-7.9
ESR1	雌激素受体 1	-7.9
EGFR	上皮生长因子受体	-7.8
FN1	纤连蛋白 1	-7.7
PARP1	聚 ADP-核糖聚合酶 1	-7.2

记细胞核,以检测 ROS 在 HUVEC 中的含量。结果显示(图 6),与 Control 组相比,H₂O₂ 组中的细胞显示出相当高水平的 ROS($F=17.77, P<0.001$);与 H₂O₂ 组相比,用不同剂量柚皮苷二氢查尔酮预处理 HUVEC 2 h 后,DCFH-DA 的荧光信号显著减弱,H 组处理下最为明显($P<0.01$)。

2.2.3 免疫荧光检测柚皮苷二氢查尔酮下调细胞

内 Cleaved caspase-3 的表达 为验证柚皮苷二氢查尔酮能否抑制 H₂O₂ 诱导的 HUVEC 细胞凋亡,用荧光二抗标记胞质内的 Cleaved caspase-3,并用 DAPI 标记细胞核,进行免疫荧光染色。结果(图 7)显示,与 Control 组相比,H₂O₂ 组中的细胞 Cleaved caspase-3 的表达显著上调($F=73.31, P<0.001$);与 H₂O₂ 组相比,柚皮苷二氢查尔酮预处理给药组能明显抑制其表达,H 组处理抑制效果最好($P<0.001$),并呈浓度依赖性。

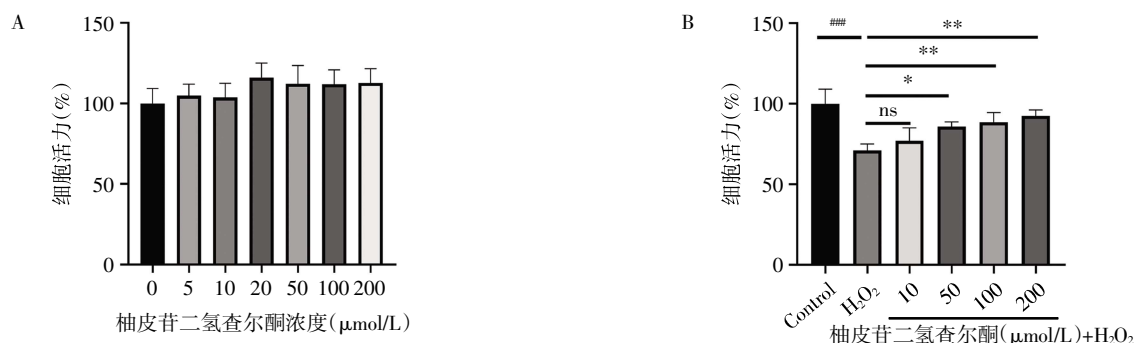
2.2.4 柚皮苷二氢查尔酮对 NF-κB 通路中调控细胞炎症关键蛋白表达的影响 如图 8 所示,与 Control 组比较,H₂O₂ 组的 NF-κB p65、MMP-9 和 TNF-α 的蛋白表达量明显上升($F=22.65, 18.64, 9.97$, 均 $P<0.05$);与 H₂O₂ 组相比,100 μmol/L 柚皮苷二氢查尔酮使得 NF-κB p65、MMP-9 和 TNF-α 的蛋白表达显著下调(均 $P<0.01$);50 μmol/L 柚皮苷二氢查尔酮对 NF-κB p65 的下调作用不明显,对 MMP-9 和 TNF-α 的表达调节效果较弱(均 $P<0.05$)。结果表明柚皮苷二氢查尔酮可以通过抑制 NF-κB 通路,降低 MMP-9 和炎症因子 TNF-α 的表达,从而在 AS 微环境中实现抗炎的作用。



注:A:柚皮苷二氢查尔酮与 MCC 评分前 5 个关键靶点的结合;B:柚皮苷二氢查尔酮与 MCC 评分后 5 个关键靶点的结合

图 4 柚皮苷二氢查尔酮与关键靶点的分子对接的 2D 和 3D 可视化结果

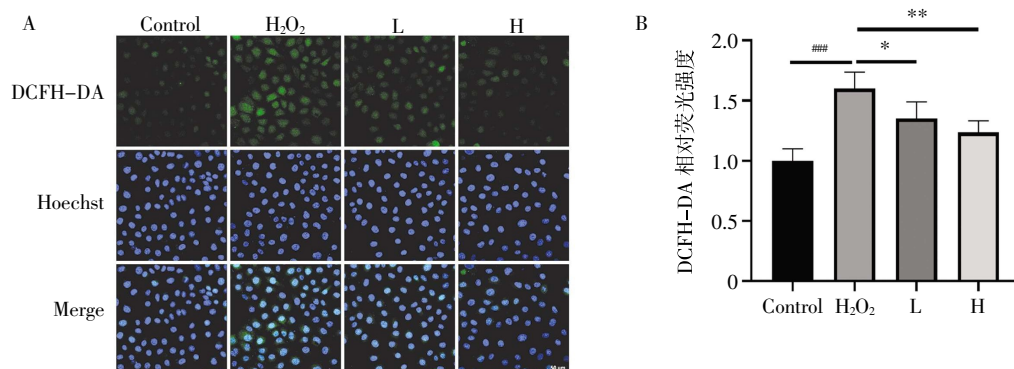
Fig.4 2D and 3D visualizations of the molecule docking of naringin dihydrochalcone with key targets



注:Control 组:正常对照组;H₂O₂ 组:H₂O₂(400 μmol/L)组;与 Control 组相比:###*P* < 0.001;与 H₂O₂ 组相比:**P* < 0.05,***P* < 0.01,ns:无统计学意义;A:柚皮苷二氢查尔酮的生物相容性;B:柚皮苷二氢查尔酮对 H₂O₂ 诱导的 HUVEC 细胞存活率的影响

图 5 柚皮苷二氢查尔酮对 HUVEC 细胞活力的影响

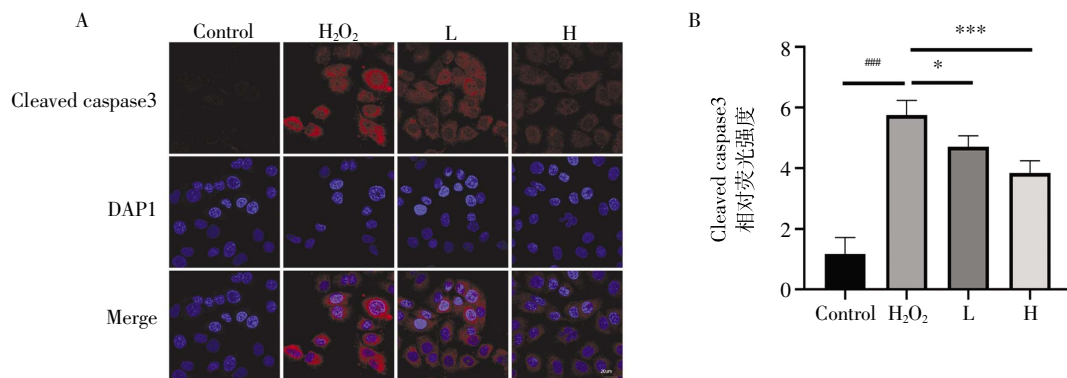
Fig.5 Effect of naringin dihydrochalcone on HUVEC cell viability



注:Control 组:正常对照组;H₂O₂ 组:H₂O₂(400 μmol/L)组;L 组:H₂O₂(400 μmol/L)+柚皮苷二氢查尔酮(50 μmol/L)组;H 组:H₂O₂(400 μmol/L)+柚皮苷二氢查尔酮(100 μmol/L)组;与 Control 组相比:###*P* < 0.001;与 H₂O₂ 组相比:**P* < 0.05,***P* < 0.01;A:通过 DCFH-DA 荧光探针检测 HUVEC 内 ROS 的水平,比例尺=50 μm;B:通过 Image J 软件定量 DCFH-DA 的荧光强度;ROS:活性氧簇

图 6 柚皮苷二氢查尔酮抑制 HUVEC 细胞内 ROS 的生成

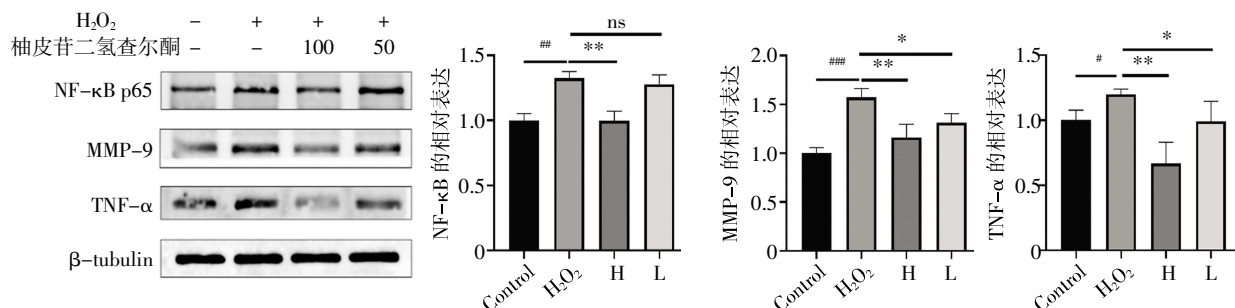
Fig.6 Naringin dihydrochalcone inhibits the production of ROS in HUVEC



注: Control 组: 正常对照组; H₂O₂ 组: H₂O₂ (400 μmol/L) 组; L 组: H₂O₂ (400 μmol/L) + 柚皮苷二氢查尔酮 (50 μmol/L) 组; H 组: H₂O₂ (400 μmol/L) + 柚皮苷二氢查尔酮 (100 μmol/L) 组; 与 Control 组相比: $^{##}P < 0.001$; 与 H₂O₂ 组相比: $^{*}P < 0.05$, $^{***}P < 0.001$; A: 免疫荧光染色检测 HUVEC 细胞内 Cleaved caspase-3 的表达水平, 比例尺=20 μm; B: 通过 Image J 软件定量 Cleaved caspase-3 的荧光强度

图7 柚皮苷二氢查尔酮下调 HUVEC 内 Cleaved caspase-3 的生成

Fig.7 Naringin dihydrochalcone downregulates the production of Cleaved caspase-3 in HUVEC



注: NF-κB p65: 核因子 κB p65; TNF-α: 肿瘤坏死因子-α; MMP-9: 基质金属蛋白酶-9; Control 组: 正常对照组; H₂O₂ 组: H₂O₂ (400 μmol/L) 组; H 组: H₂O₂ (400 μmol/L) + 柚皮苷二氢查尔酮 (100 μmol/L) 组; L 组: H₂O₂ (400 μmol/L) + 柚皮苷二氢查尔酮 (50 μmol/L) 组; 与 Control 组相比, $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$; 与 H₂O₂ 组相比, $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, ns: 差异无统计学意义

图8 柚皮苷二氢查尔酮对 H₂O₂ 诱导的 HUVEC 内 NF-κB 及下游蛋白表达的影响

Fig.8 The impact of naringin dihydrochalcone on the expression of NF-κB and downstream proteins in HUVEC induced by H₂O₂

3 讨论

AS 的发病机制涉及脂质的浸润、内皮损伤、炎症反应、免疫反应和血流动力学效应等多种可能^[11-12]。目前,临床上治疗 AS 的用药大多以降血脂类、抗氧化类、抗血小板聚集类、降压类等传统西药为主,均存在一定的不良反应并易产生药物依赖性,因此开发出新型的抗 AS 药物已经成为一种趋势。既往实验表明,天然药物成分治疗心血管疾病有着较为显著的效果,例如天然黄酮类(包括柚皮苷)对心血管疾病的作用已有报道,高黄酮摄入量与心血管风险呈负相关^[13-14],且柚皮苷通过抗炎、抗氧化、抗细胞凋亡及自噬等作用抑制 AS 的发生、发展^[15]。柚皮苷二氢查尔酮也被报道具有抗氧化能力^[16],但其作用靶点还未明确,治疗 AS 的具体机制尚未被深入的研究。因此,本研究整合了网络药理学和分子对接技术,对柚皮苷二氢查尔酮抑制 AS 的潜在作用机制进行探讨和分析。

本研究通过 PPI 拓扑分析筛选得到 EGFR、CASP3、ESR1、MTOR、FNI、MMP9、PARP1、PIK3CA、

CTSD、CDK2 是柚皮苷二氢查尔酮治疗 AS 的潜在核心靶点。根据分子对接能量来进一步评估化合物与核心靶点的结合能力,结果显示,上述靶点与柚皮苷二氢查尔酮的结合能均 < -5.0 kcal/mol,这表明两者具有良好的结合力,提示柚皮苷二氢查尔酮可能通过作用于 AS 的多个靶点来发挥治疗作用。

表皮生长因子受体(EGFR)是一种酪氨酸激酶型受体,在巨噬细胞、血管平滑肌细胞、内皮细胞和心肌细胞中均有表达,参与 AS 的病理生理过程^[17]。研究表明 EGFR 导致 NF-κB 通路的下游激活,并刺激巨噬细胞促炎基因的转录,加重斑块微环境中的氧化应激^[18]。Zhang 等^[19]研究发现,一些细胞因子能导致 EGFR 的反式激活从而活化 MAPK-ERK 信号通路,诱导血管平滑肌细胞增殖,促进 AS 的形成。MMP-9 是一种分泌蛋白,能被分泌到胞外降解基质,引起一系列炎症反应^[20]。炎症因子通过激活 NF-κB 通路刺激 MMP-9 在人内皮细胞、平滑肌细胞和巨噬细胞中表达,而 MMP-9 的高表达可使血管内皮通透增加,加速脂质和炎症细胞的浸润,从而加

剧 AS 炎症反应^[21]。还有研究显示, MMP-9 能导致血管内皮细胞屏障受损, 促进血管平滑肌细胞的迁移和增殖, 造成斑块破裂^[22]。以上研究表明, 柚皮苷二氢查尔酮可能通过抑制 EGFR 和 MMP-9 的表达, 从而抑制 NF- κ B、MAPK-ERK 通路的激活, 其在 AS 的抗炎治疗中扮演着重要角色。

PIK3CA 基因参与细胞的增殖、分化和凋亡等生命过程的调控, 已有研究证实, AS 中 PIK3CA 基因表达增强^[23]。PI3K 是 PIK3CA 基因的表达产物, 其可通过 PI3K/Akt 通路影响炎症因子的表达来调节巨噬细胞极化、自噬和脂代谢功能, 进而改变 AS 发展进程^[24]。抑制 PI3K 能放大 AS 斑块早期的自噬进程和血管内皮损伤扩张^[25]。哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)在细胞自噬中扮演关键的抑制性角色, 其激活可促进 AS 的发展^[26]。AS 中巨噬细胞的自噬受到 PI3K/Akt/mTOR 的调控, 当该通路被抑制时, 巨噬细胞的自噬水平会上调^[27]。因此, 柚皮苷二氢查尔酮有可能通过选择性抑制 PIK3CA 和 MTOR 基因的表达从而抑制 PI3K/Akt/mTOR 信号途径, 激发巨噬细胞自噬现象, 减少斑块内巨噬细胞渗透, 抑制炎症反应, 进一步巩固易损斑块。

Caspase-3 是半胱氨酸蛋白酶(CASP)家族的核心成员。据报道, 当血管内皮细胞受损时, 激活的 caspase-3 诱导细胞凋亡, 从而导致内皮功能紊乱, 成为 AS 病变的启动因素^[28]。PARP1 是多聚 ADP 核糖聚合酶家族(PARP)中的一员, 具有修复受损的 DNA 的功能, 然而 PARP1 在 DNA 受到严重破坏时会激活 caspase-3, 被其特异性剪切, 导致细胞凋亡^[29]。研究表明, 抑制 PARP1 可减少血管内皮细胞黏附因子、炎症因子和 caspase-3 的表达, 抑制 AS 斑块的破坏^[30]。此外, PARP1 还可通过改变 MMP 和金属蛋白酶组织抑制剂的比例来促进 AS 斑块的破坏^[28]。组织蛋白酶 D(CTSD)是一种溶酶体天冬氨酸蛋白酶, 可被细胞自噬激活, 进而导致细胞凋亡^[31]。已有研究证实, 在人 AS 斑块中 CTSD 的高度表达, 推动了巨噬细胞转变为泡沫细胞。细胞周期蛋白依赖性激酶 2(CDK2)在细胞增殖、分化和凋亡中起着调控作用, 因此抑制巨噬细胞或血管平滑肌细胞中 CKD2 的表达可促进其凋亡, 用于 AS 治疗中^[32]。结合以上研究成果, 合理推测柚皮苷二氢查尔酮通过抑制 caspase-3、PARP1、CTSD、CDK2 的表达, 从而抑制细胞凋亡、改善血管内皮功能、稳定斑块, 达到治疗 AS 的目的。

纤连蛋白 1(FN1)与细胞外基质的形成有关, 也在细胞黏附和迁移过程中发挥作用。FN1 在 AS

纤维斑块中过表达, 是 AS 过程中纤维斑块形成的指标。雌激素受体 1(ESR1)基因编码 ER, 已有研究证据支持, 各类 ER 可以通过抗氧化应激、降低血管平滑肌细胞分化、减少斑块钙化等作用防止 AS 的发生和发展^[33]。但是目前在 AS 的相关研究中, FN1 和 ESR1 的作用机制尚未详细阐述, 仍需要进一步深入探索研究。

为了验证上述分析结果, 笔者以 HUVEC 为研究对象, 选用 H₂O₂ 模拟 AS 的氧化应激微环境, 通过共聚焦显微镜观察细胞内 ROS 和 Cleaved caspase-3 的含量, 揭示了柚皮苷二氢查尔酮可有效抑制 H₂O₂ 诱导的细胞氧化应激和凋亡; 通过 Western 印迹实验揭示了柚皮苷二氢查尔酮可通过 NF- κ B 通路抑制 H₂O₂ 诱导的 MMP-9 和 TNF- α 蛋白表达, 减缓细胞炎症, 维持 AS 微环境的稳态。

综上所述, 本研究借助网络药物学和分子对接分析技术, 初步探讨了柚皮苷二氢查尔酮通过多靶点、多通路治疗 AS 的潜在作用机制, 发现柚皮苷二氢查尔酮治疗 AS 的核心靶点有 EGFR、CASP3、ESR1、MTOR、FN1、MMP9、PARP1、PIK3CA、CTSD、CDK2, 主要通过调控炎症、凋亡、PI3K/Akt 信号通路等起到干预 AS 的作用。通过体外细胞实验进一步验证了柚皮苷二氢查尔酮在 CASP3 及 MMP-9 靶点和 NF- κ B 信号通路中的作用, 初步证实了其在 AS 中抗炎、抗氧化应激及抗凋亡作用。此外分子对接结果表明, 柚皮苷二氢查尔酮与核心靶点间都具有较强结合活性, 是治疗 AS 的潜在有效成分, 这为进一步探索柚皮苷二氢查尔酮治疗 AS 的作用机制提供了理论依据, 具有一定的参考价值, 但其具体的临床疗效有待进一步实验验证。

参考文献:

- [1] KOBAYAMA K, LEY K. Atherosclerosis[J]. Circ Res, 2018, 123(10): 1118-1120.
- [2] LIBBY P, BURING J E, BADIMON L, et al. Atherosclerosis[J]. Nat Rev Dis Primers, 2019, 5(1): 56.
- [3] VINCI P, PANIZON E, TOSONI L M, et al. Statin-associated myopathy: emphasis on mechanisms and targeted therapy[J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(21): 11687.
- [4] ZHAO Y, LIU S. Bioactivity of naringin and related mechanisms[J]. Pharmazie, 2021, 76(8): 359-363.
- [5] GANDHI G R, VASCONCELOS ABS, WU D T, et al. Citrus flavonoids as promising phytochemicals targeting diabetes and related complications: a systematic review of *in vitro* and *in vivo* studies[J]. Nutrients, 2020, 12(10): 2907.
- [6] ZHAO H, LIU M, LIU H, et al. Naringin protects endothelial cells from apoptosis and inflammation by regulating the Hippo-YAP

- pathway[J]. *Biosci Rep*, 2020, 40(3): BSR20193431.
- [7] YADAV M, SEHRAWAT N, SINGH M, et al. Cardioprotective and hepatoprotective potential of citrus flavonoid naringin: current status and future perspectives for health benefits[J]. *Asian J Biol Life Sci*, 2020, 9(1): 1–5.
- [8] 黄凯,毛子剑,刘学魁,等.柚皮苷制备柚皮苷二氢查尔酮的氢化工艺优化[J].*中国食品添加剂*,2024,35(2):48–57.
- [9] CHOI J M, YOON B S, LEE S K, et al. Antioxidant properties of neohesperidin dihydrochalcone: inhibition of hypochlorous acid-induced DNA strand breakage, protein degradation, and cell death[J]. *Biol Pharm Bull*, 2007, 30(2): 324–330.
- [10] WANG F, ZHAO C, TIAN G, et al. Naringin alleviates atherosclerosis in ApoE^{−/−} mice by regulating cholesterol metabolism involved in gut microbiota remodeling[J]. *J Agric Food Chem*, 2020, 68(45): 12651–12660.
- [11] BURNETT J R, HOOPER A J, HEGELE R A. Remnant cholesterol and atherosclerotic cardiovascular disease risk[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2020, 76(23): 2736–2739.
- [12] KAMSTRUP P R. Lipoprotein(a) and cardiovascular disease[J]. *Clin Chem*, 2021, 67(1): 154–166.
- [13] YAMADA T, HAYASAKA S, SHIBATA Y, et al. Frequency of citrus fruit intake is associated with the incidence of cardiovascular disease: the Jichi Medical School cohort study[J]. *J Epidemiol*, 2011, 21(3): 169–175.
- [14] TESTAI L, CALDERONE V. Nutraceutical value of citrus flavanones and their implications in cardiovascular disease[J]. *Nutrients*, 2017, 9(5): 502.
- [15] WANG F, ZHAO C, YANG M, et al. Four citrus flavanones exert atherosclerosis alleviation effects in ApoE^{−/−} mice via different metabolic and signaling pathways[J]. *J Agric Food Chem*, 2021, 69(17): 5226–5237.
- [16] 彭颖,何婉莺,范鑫,等.柚皮苷二氢查尔酮的抗氧化活性研究[J].*中国食品学报*, 2021, 21(2): 45–54.
- [17] SCHREIER B, GEKLE M, GROSSMANN C. Role of epidermal growth factor receptor in vascular structure and function[J]. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 2014, 23(2): 113–121.
- [18] WANG L, HUANG Z, HUANG W, et al. Inhibition of epidermal growth factor receptor attenuates atherosclerosis via decreasing inflammation and oxidative stress[J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 45917.
- [19] ZHANG H, CHALOTHORN D, JACKSON L F, et al. Transactivation of epidermal growth factor receptor mediates catecholamine-induced growth of vascular smooth muscle[J]. *Circ Res*, 2004, 95(10): 989–997.
- [20] LINDSEY M L. Assigning matrix metalloproteinase roles in ischemic cardiac remodeling[J]. *Nat Rev Cardiol*, 2018, 15(8): 471–479.
- [21] NJAU F, HALLER H. Calcium dobesilate modulates PKC δ -NADPH oxidase-MAPK-NF- κ B signaling pathway to reduce CD14, TLR4, and MMP9 expression during monocyte-to-macrophage differentiation: potential therapeutic implications for atherosclerosis[J]. *Antioxidants*, 2021, 10(11): 1798.
- [22] 童辉煜,黄裕立,胡允兆.基质金属蛋白酶9在动脉粥样硬化中的研究进展[J].*中国动脉硬化杂志*,2016,24(8):855–859.
- [23] SHAO W, WANG S, WANG X, et al. miRNA-29a inhibits atherosclerotic plaque formation by mediating macrophage autophagy via PI3K/AKT/mTOR pathway[J]. *Aging (Albany NY)*, 2022, 14(5): 2418–2431.
- [24] BABAEV V R, DING L, ZHANG Y, et al. Macrophage IKK α deficiency suppresses Akt phosphorylation, reduces cell survival, and decreases early atherosclerosis[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2016, 36(4): 598–607.
- [25] 孟中华,尚莎莎,王建茹,等.巨噬细胞 PI3K/Akt 通路与动脉粥样硬化的研究进展[J].*中国免疫学杂志*,2022,38(1):102–106.
- [26] XIONG Y, YEPURI G, FORBITEH M, et al. ARG2 impairs endothelial autophagy through regulation of MTOR and PRKAA/AMPK signaling in advanced atherosclerosis[J]. *Autophagy*, 2014, 10(12): 2223–2238.
- [27] ZHAI C, CHENG J, MUJAHID H, et al. Selective inhibition of PI3K/Akt/mTOR signaling pathway regulates autophagy of macrophage and vulnerability of atherosclerotic plaque[J]. *PLoS One*, 2014, 9(3): e90563.
- [28] XU S, BAI P, LITTLE P J, et al. Poly(ADP-ribose) polymerase 1 (PARP1) in atherosclerosis: from molecular mechanisms to therapeutic implications[J]. *Med Res Rev*, 2014, 34(3): 644–675.
- [29] SAIRANEN T, SZEPESEI R, KARJALAINEN-LINDSBERG M L, et al. Neuronal caspase-3 and PARP-1 correlate differentially with apoptosis and necrosis in ischemic human stroke[J]. *Acta Neuropathol*, 2009, 118(4): 541–552.
- [30] HENNING R J, BOURGEOIS M, HARBISON R D. Poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) and PARP inhibitors: mechanisms of action and role in cardiovascular disorders[J]. *Cardiovasc Toxicol*, 2018, 18(6): 493–506.
- [31] DI Y Q, HAN X L, KANG X L, et al. Autophagy triggers CTSD (cathepsin D) maturation and localization inside cells to promote apoptosis[J]. *Autophagy*, 2021, 17(5): 1170–1192.
- [32] WESSELY R. Atherosclerosis and cell cycle: put the brakes on! critical role for cyclin-dependent kinase inhibitors[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2010, 55(20): 2269–2271.
- [33] ARYAN L, YOUNESSI D, ZARGARI M, et al. The role of estrogen receptors in cardiovascular disease[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(12): 4314.

(2024-08-12 收稿)