基于网络药理学研究新“浙八味”衢枳壳黄酮抗肝细胞癌的作用机制

高亮[1,2]，张亚琳[2]，武雨含[2]，邵佳慧[2]，张慧[1]，邵益丹[3]，许亚萍[4*]，蒋剑平[2,5*][1. 浙江工业大学药学院，杭州 310014；2. 浙大城市学院医学院，杭州 310015；3. 杭州市西溪医院，杭州 310023；4. 浙江中医药大学附属第一医院 (浙江省中医院)，杭州 310006；5. 浙大城市学院附属医院，杭州 311300]

摘要：目的 基于网络药理学预测并通过实验验证新“浙八味”衢枳壳黄酮类活性成分抗肝细胞癌的作用机制。**方法** 通过 TCMSP、TCMID、ETCM、BATMAN-TCM 及 SwissTargetPrediction 数据库收集衢枳壳黄酮类化合物 (包括柚皮苷、芸香柚皮苷、新橙皮苷) 的潜在作用靶点；应用 GeneCards、CTD、Disgenet 和 OMIM 数据库构建肝细胞癌疾病靶点集；将衢枳壳黄酮潜在靶点与肝细胞癌靶点取交集以获取关键靶点蛋白，建立蛋白互作网络；对核心靶点进行 GO 功能和 KEGG 通路富集分析，并构建成分-靶点-通路-疾病网络；采用增殖、克隆、愈合与迁移试验分析衢枳壳黄酮对肝癌细胞 HepG2 活力的影响；使用荧光探针染色观察衢枳壳黄酮对 HepG2 细胞线粒体膜电位与凋亡的影响；运用 RT-qPCR 技术验证衢枳壳黄酮对网络药理学预测的关键靶点 PRKCA 的调控作用。**结果** 基于网络药理学筛选得到 217 个衢枳壳黄酮的作用靶点，与疾病靶点的交集靶点 59 个，涉及 ALB、ESR1、PRKCA 等。GO 功能与 KEGG 通路富集分析显示，衢枳壳黄酮作用靶点共涉及 193 个生物学过程，13 条癌症相关信号通路。实验结果表明衢枳壳黄酮能影响肝癌细胞的增殖、克隆、愈合与迁移能力，导致线粒体膜电位下降并促进细胞凋亡。RT-qPCR 的结果表明衢枳壳黄酮能够显著下调 PRKCA 表达，验证了网络药理学的预测分析结果。**结论** 本研究揭示了衢枳壳黄酮通过 PRKCA 靶点治疗肝细胞癌的潜在分子作用机制，为其临床防治肝细胞癌的应用奠定基础。

关键词：衢枳壳；黄酮；网络药理学；肝细胞癌；凋亡；PRKCA

中图分类号：R285.5　　**文献标志码：**A　　**文章编号：**1007-7693(2024)02-0166-11

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.20232688

引用本文：高亮, 张亚琳, 武雨含, 等. 基于网络药理学研究新“浙八味”衢枳壳黄酮抗肝细胞癌的作用机制[J]. 中国现代应用药学, 2024, 41(2): 166-176.

Study on the Mechanism of the Flavonoids from the New "Zhe Eight Flavors" Quzhou Fructus Aurantii Against Hepatocellular Carcinoma Based on Network Pharmacology

GAO Liang[1,2], ZHANG Yalin[2], WU Yuhan[2], SHAO Jiahui[2], ZHANG Hui[1], SHAO Yidan[3], XU Yaping[4*], JIANG Jianping[2,5*][*1.College of Pharmaceutical Science, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310014, China; 2.School of Medicine, Hangzhou City University, Hangzhou 310015, China; 3.Hangzhou Xixi Hospital, Hangzhou 310023, China; 4.The First Affliated Hospital of Zhejiang Chinese Medical University(Zhejiang Provincial Hospital of Chinese Medicine), Hangzhou 310006, China; 5.Affiliated Hospital, Hangzhou City University, Hangzhou 311300, China*]

ABSTRACT: OBJECTIVE To explore the mechanisms of the flavonoids from new "Zhe Eight Flavors" Quzhou Fructus Aurantii(PTFC) against hepatocellular carcinoma based on the prediction of network pharmacology and experimental verification. **METHODS** From TCMSP, TCMID, ETCM, BATMAN-TCM and SwissTargetPrediction databases, the potential target proteins of PTFC, including naringin, narirutin and neohesperidin were collected. Based on the GeneCards, CTD, Disgenet, and OMIM databases, a set of target proteins for hepatocellular carcinoma was constructed. Taking the intersection of potential target proteins of PTFC and target proteins of hepatocellular carcinoma, key target proteins were obtained and a protein-protein interaction network was established. Besides, GO function and KEGG pathway enrichment analysis on the core target proteins was performed and a Compounds-Targets-Pathways-Disease network was constructed. Through proliferation, cloning, wound healing, and migration experiments, the effects of PTFC on the viability of HepG2 liver cancer cells were analyzed. Using fluorescence probe staining the

基金项目：国家自然科学基金面上项目 (82074186)；浙江省高层次人才“特支计划”青年拔尖人才项目 (ZJWR0108035)；国家教育部产学合作协同育人项目 (202102242035)；杭州市医药卫生科技 (重点) 项目 (ZD20230028)；浙江省中医药科技计划项目 (2024ZF074)；浙江省教育厅一般科研项目 (Y202352924)

作者简介：高亮，男　E-mail: gaofeiyuhaoren@outlook.com　*通信作者：蒋剑平，男，博士，教授　E-mail: jiangjp@hzcu.edu.cn　许亚萍，女，主管中药师　E-mail: 29645106@qq.com

impacts of PTFC on the mitochondrial membrane potential and apoptosis of HepG2 were observed. Finally, the validation of the regulatory effect of PTFC on the key predicted target PRKCA were carried out through RT-qPCR. **RESULTS** Based on network pharmacology, a total of 217 potential target proteins for PTFC were screened, with 59 intersecting target proteins related to diseases, including ALB, ESR1, PRKCA, and others. GO functional and KEGG pathway enrichment analysis revealed that the PTFC target proteins were involved in 193 biological processes and 13 cancer-related signaling pathways. Experimental results demonstrated that PTFC could impact the proliferation, cloning, wound healing, and migration abilities of liver cancer cells, leading to a decrease in mitochondrial membrane potential and promoting cell apoptosis. The results of RT-qPCR confirmed a significant downregulation of PRKCA expression by PTFC, validating the predictions made by network pharmacology analysis. **CONCLUSION** This study has revealed the potential molecular mechanism of PTFC treating hepatocellular carcinoma via the PRKCA target, laying the foundation for clinical application of PTFC.
KEYWORDS: Quzhou Fructus Aurantii; flavonoids; network pharmacology; hepatocellular carcinoma; apoptosis; PRKCA

全球癌症观察组织 (GLOBOCAN) 研究表明，由于人口规模等因素影响，全球大多数癌症病例发生在中国。其中原发性肝癌是全球第六、中国第二常见的癌症，据估计，2020 年全球约有 90.6 万例新增病例和 83.0 万例死亡病例[1]。原发性肝癌包括肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma，HCC) 和肝内胆管癌。其中，HCC 约占原发性肝癌病例总数的 90%[2]。中国是 HCC 高风险区，每年新增病例占全球病例的 50% 以上。目前研究认为，HCC 是由多因素协同作用的多阶段疾病，乙型肝炎病毒或丙型肝炎病毒感染和酒精性肝病是诱发 HCC 的重要危险因素[3-4]。现代医学治疗手段主要为手术局部治疗和全身药物治疗结合，但存在耐药性和不良反应等问题[5-6]。

中药已被广泛报道用于治疗多种全身性疾病，包括难治性癌症。因其具有多靶点，不良反应少，减毒增效等优势，成为近年来抗肿瘤药物研究的热点。中药通过抑制肿瘤生长、诱导细胞凋亡、调控肿瘤微环境等多途径作用机制发挥药效，并部分改善癌症患者的耐药性[7]。中药作为 HCC 治疗的一种辅助手段，探究其抗肿瘤的作用机制具有重要意义。

新“浙八味”衢枳壳系芸香科植物常山胡柚 *Citrus aurantium* ‘Changshan-huyou’的青果炮制品，于 2015 年收录在《浙江省中药炮制规范》(2015 版)，并在 2019 年、2020 年分别入选中国农业品牌目录与中欧地理标志保护名单。衢枳壳味辛、苦，归经于脾、胃，研究表明，衢枳壳提取物中的黄酮类物质具有抗炎[8]、抗氧化[9]、抗肿瘤[10]等多种药理作用。衢枳壳中黄酮类物质作用靶点较多，药理作用广泛，但其治疗 HCC 的机制尚不清楚。基于中药多成分、多靶点、多途径的作用特点，本研究采用网络药理学方法，构建成分-靶点-通路-疾病网络，筛选出衢枳壳黄酮类成分的核心作用靶点并进行体外验证，为揭示衢枳壳抗 HCC 的作用机制提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 细胞

HepG2 细胞株购自中国科学院上海细胞库。

1.2 药物与试剂

衢枳壳药材 (批号：2010040) 购自衢州南孔中药有限公司，经浙大城市学院附属医院陈新江主任中药师鉴定为常山胡柚 *Citrus aurantium* ‘Changshan-huyou’的干燥未成熟果实加工炮制品；衢枳壳黄酮由本课题组前期提取并鉴定，提取方法见参考文献 [11]，经测定主要黄酮类成分含量为 80.7%，分别为柚皮苷 (90.58 $mg \cdot g^{-1}$)、芸香柚皮苷 (7.81 $mg \cdot g^{-1}$) 及新橙皮苷 (112.77 $mg \cdot g^{-1}$)，相关提取技术已获批国家发明专利 (CN201210118093.9、CN201110269192.2、CN201110156457.8)。

DMEM 高糖培养液 (货号：C0006)、EDTA-胰酶 (货号：CY003)、PBS(货号：CP006) 均购自杭州科易生物技术有限公司；胎牛血清 (德国 SERANA 公司，货号：S-FBS-SA-015)；磺酰罗丹明 B 染色液 (美国 Sigma 公司，批号：SHBL9542)；结晶紫染色液 (批号：21285032)、4% 多聚甲醛 (批号：22315976) 均购自兰杰柯科技有限公司；Transwell 培养板 (美国 Costar 公司，货号：3422)；MitoTracker Red CMXRos/Annexin V-FITC试剂盒 (上海碧云天生物技术有限公司，批号：121622230511)；RNA 快速提取试剂盒 (上海奕杉生物科技有限公司，批号：20221101)；qPCR 96 孔板 (杭州维拓生物技术有限公司，批号：20221225)；三氯乙酸 (北京雷根生物技术有限公司，批号：0324A22)；乙酸、无水乙醇均为分析纯，均

购自天津市永大化学试剂有限公司。

1.3 仪器

Synergy LX 多功能酶标仪 (美国 BioTek 公司)；NYC-80S 转移脱色摇床 (泰州诺米医疗科技有限公司)；Axio Vert.A1 倒置生物显微镜 (德国 Zeiss 公司)；X-Cite 120 LED mini 显微镜荧光光源 (美国 Excelitas 公司)；ME104E/02 电子分析天平 (梅特勒-托利多仪器上海有限公司)；Vortex Genie2 SI-0246 涡旋振荡器 (美国 Scientific Industries 公司)；Nano-300 微量分光光度计 (杭州奥盛仪器有限公司)；T100™ Thermal Cycler 梯度 PCR 仪 (美国 BIO-RAD 公司)；LightCycler 96 荧光定量 PCR 仪 (瑞士 Roche 公司)。

1.4 网络药理学

1.4.1 数据库　TCMSP 数据库 (https://tcmsp-e.com/tcmsp.php)、PubChem 数据库 (https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/)、TCMID数据库(http://bidd.group/TCMID/)、SwissTargetPrediction 数据库 (http://www.swissadme.ch/index.php)、ETCM数据库(http://www.tcmip.cn/ETCM/index.php)、BATMAN-TCM 数据库 (http://bionet.ncpsb.org.cn/batman-tcm/index.php)、TargetNet 数据库 (http://targetnet.scbdd.com/) GeneCards数据库 (https://genecards.weizmann.ac.il/v3/)、Uniprot 数据库 (https://www.uniprot.org/)、OMIM 数据库 (https://www.omim.org)、STRING 数据库 (https://string-db.org/)、Disgenet 数据库 (https://www.disgenet.org/)、DAVID 数据库 (https://david.ncifcrf.gov/)。

1.4.2 衢枳壳黄酮化学成分与靶点基因筛选　根据质谱鉴定的衢枳壳中的化学成分[11]，通过 TCMSP、TCMID、ETCM、BATMAN-TCM 及 SwissTargetPrediction 数据库检索衢枳壳黄酮的潜在作用靶点，具体的成分靶点筛选条件设置如下：设置药材检索关键词“枳壳”“ZHI KE”或“ZHI QIAO”，TCMSP 选择口服生物利用度 (oral bioavailability，OB)≥30% 或类药性 (drug-likeness，DL)≥0.18；设置成分靶点检索关键词“naringin”“narirutin”及“neohesperidin”，从 PubChem 数据库中得到相应结构的 Canonical SMILES，ETCM 保留可靠性分值>0.8 的靶标；Target-Net 选择曲线下面积 (area under the curve，AUC)≥0.7，可能性 (probability，Prob)＞0；Swiss TargetPrediction 筛选保留 Prob＞0；BATMAN-TCM 选择 Score 值≥2.5。上述数据结果均采用 Uniprot 数据库中的已验证“Homo sapiens”蛋白数据标准化，排除无内容靶点。

1.4.3 衢枳壳黄酮成分抗肝细胞癌靶点基因收集　HCC 疾病基因下载、筛选自 GeneCards、CTD、Disgenet 和 OMIM 数据库，相关关键词为“hepatocellular carcinoma”。上述数据合并去重，得到衢枳壳黄酮化学成分与 HCC 的基因表达交集，数据结果均采用 Uniprot 数据库中的已验证“Homo sapiens”蛋白数据标准化，排除无内容靶点。

1.4.4 蛋白质-蛋白质相互作用 (protein-protein interaction，PPI) 网络构建及分析　将交集基因上传至 STRING 数据库，设置 Organisms 为“Homo sapiens”，最低相互作用评分分别为“medium confidence(0.400)”，隐藏无关联节点蛋白，得到不同相互作用下的 PPI 网络。随后利用 Cytoscape 3.7.2 载入 TSV 文件，筛选得到衢枳壳黄酮抗肝癌的核心靶点，绘制 PPI 网络，并对核心靶点进行拓扑分析。

1.4.5 GO/KEGG 靶点功能及通路分析　将交集基因上传至 DAVID 数据库，标识符设置“OFFICAL_GENE_SYMBOL”，物种选择“Human”，下载获取 GO 功能和 KEGG 通路富集数据，利用微生信在线可视化平台分析包括生物学过程、细胞组成、分子功能及 KEGG 富集分析衢枳壳 3 种黄酮成分抗 HCC 的相关生物通路。

1.4.6 成分-靶点-通路-疾病网络构建　利用 Cytoscape 3.7.2 将衢枳壳 3 种黄酮类成分靶点与 HCC 相关靶点及通路进行可视化，构建成分-靶点-通路-疾病网络。

1.5 研究内容

1.5.1 药物制备　将常山胡柚的果皮去除、清洗并切碎、晒干而得。将衢枳壳粉碎后按 1∶16 的料液比加入 0.10% $Ca(OH)_2$ 溶液沸水浸泡 1.5 h 后过滤、蒸干并溶解在 10 倍体积的蒸馏水中。将上述提取液按质量比 1∶20 过 HPD-300 大孔树脂柱，用 2 倍柱床体积的乙醇 (0%，30%，50%，70%，90%) 以 1 $mL \cdot min^{-1}$ 流速进行梯度洗脱，其中收集 30% 的洗脱组分并浓缩至干作为衢枳壳黄酮提取物。电子天平称量一定质量的衢枳壳黄酮粉末并溶解于适当体积的 PBS 制成 100 $mg \cdot mL^{-1}$ 的衢枳壳黄酮药物母液，经 0.22 μm 滤膜于超净台内过滤后分装、稀释成 50，25，12.5，6.25 $mg \cdot mL^{-1}$

的溶液，−20 ℃保存备用。

1.5.2 细胞分组 采用DMEM高糖培养液(含10%胎牛血清和1%青链霉素)于37℃、5%CO_2条件下常规培养HepG2细胞。实验分组为空白组、衢枳壳黄酮低剂量组(0.125 mg·mL^{-1})、衢枳壳黄酮中剂量组(0.250 mg·mL^{-1})、衢枳壳黄酮高剂量组(0. 500 mg·mL^{-1})。

1.5.3 MTT检测 取密度0.3×10^{4}个·mL^{-1}的对数生长期细胞铺于96孔板中，培养12 h后弃换培养液，设定5个给药梯度组分别加入等体积不同浓度(2.000，1.000，0.500，0.250，0.125 mg·mL^{-1})的衢枳壳黄酮溶液，空白组加入等体积PBS，每组重复3个平行对照孔，培养24 h。随后每孔加入一定体积MTT溶液于37 ℃、5%CO_2条件下培养4 h，弃去孔内液体后加入DMSO溶液于37 ℃恒温摇床低速震荡20 min，酶标仪测定吸光度。筛选出3个合适的药物浓度梯度，用于后续实验。

1.5.4 SRB检测 取密度0.3×10^{4}个·mL^{-1}的对数生长期细胞铺于96孔板中，培养12 h后弃换培养液并给药，分别培养1，2，3，4，5 d。在药物作用时间终点，弃去孔内液体后加入4 ℃预冷的30%TCA溶液(终浓度为10%)，4 ℃固定1 h后，ddH_2O清洗3遍并干燥，加入0.4% SRB染色液，避光静置15~30 min后用1%乙酸冲洗3次，去除未结合染料并室温晾干。加入非缓冲Tris-base (10 mmol·L^{-1}，pH=10.5)摇床震荡15 min，酶标仪测定吸光度。

1.5.5 克隆形成 取密度0.5×10^{4}个·mL^{-1}的对数生长期细胞铺于6孔板中，待细胞贴壁后，更换培养液并给药。细胞培养至形成明显克隆现象时，弃培养液，使用4%多聚甲醛固定10 min，PBS洗后用5%结晶紫染色20 min，PBS洗2次去除染液，显微镜下拍照并统计每组细胞数目。

1.5.6 划痕愈合 取密度3~5×10^{5}个·mL^{-1}的对数生长期细胞铺于6孔板中，铺匀后培养至生长密度约为80%时，使用无菌200 μL枪头垂直6孔板底部划痕，PBS清洗后更换培养液并给药。分别于划痕后0和24 h在倒置显微镜下观察细胞划痕间距，计算细胞迁移率。细胞迁移率(%)=(0 h划痕宽度−24 h划痕宽度)/0 h划痕宽度×100%。

1.5.7 TransWell迁移 取消化后的对数生长期细胞于无血清培养液，制成密度2×10^{5}个·mL^{-1}的细胞悬液。在Transwell小室下室加入含药和10%FBS的培养液，上室加入细胞悬液。培养24 h后，取出Transwell小室，使用4%多聚甲醛固定10 min，PBS洗后用5%结晶紫染色20 min，擦除上室内细胞，PBS清洗去除染液，显微镜下拍照并计数。

1.5.8 Mito-Tracker Red/Annexin V-FITC荧光共染 取密度适量的对数生长期细胞铺于24孔板中，采用不同浓度的衢枳壳黄酮给药刺激24 h后吸除细胞培养液，PBS洗涤后分别加入Annexin V-FITC、Mito-Tracker Red CMXRos和Hoechst 33342染色液，轻轻混匀，室温(20~25 ℃)避光孵育20~30 min，随后置于冰浴中，随即在荧光显微镜下观察。

1.5.9 RT-qPCR检测 将细胞铺于6孔板中，待细胞生长至密度约70%时，加入药物作用24 h。弃培养液，用预冷的PBS洗2次，加入裂解液，提取总RNA，测定浓度，反转录制备cDNA，将试剂盒中各种成分预混，将RT primer tube从−80 ℃冰箱中取出并溶解，加入相应的primer，把反应管盖好盖子，放入PCR仪。反应结束后，从电脑自动得出熔解曲线。

1.5.10 统计与分析 对实验数据结果均采用Graphpad 8.0.2进行统计分析。数据以$\bar{x}\pm s$表示，组间差异采取t检验。$P<0.05$为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 基于网络药理学构建成分-靶点-通路-疾病网络

2.1.1 衢枳壳黄酮化学成分与靶点基因筛选 通过相关数据库检索，搜集了衢枳壳的3种主要黄酮类成分柚皮苷、芸香柚皮苷、新橙皮苷的217个潜在作用靶点。

2.1.2 衢枳壳黄酮成分抗肝细胞癌靶点基因收集 从相关数据库中根据检索条件得到HCC相关靶点共2419个，得到衢枳壳黄酮成分的作用靶点与HCC相关靶点的59个交集靶点，得到jVenn图，见图1，即衢枳壳黄酮抗HCC的潜在作用靶点。

2.1.3 PPI网络构建及分析 将“2.1.2”项下59个作用靶点导入STRING数据库，得到PPI网络并运用Cytosacpe 3.7.2软件分析58个靶蛋白，根据Betweenness值发现ALB、ESR1、HSP90AA、

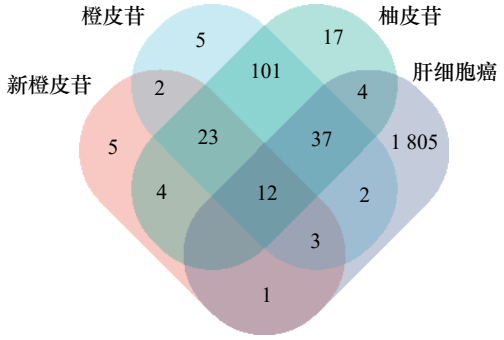

图 1 衢枳壳黄酮成分与 HCC 交集靶点 jVenn 图

Fig. 1 jVenn diagram of intersection of the flavonoids of Quzhou Fructus Aurantia and HCC targets

PTGS2 与 PRKCA 等节点在 PPI 网络中具有重要作用，见表 1。

表 1 前 10 个潜在关键蛋白

Tab. 1 Potential hub proteins ranked top 10

靶点	Degree	Betweenness	Closeness
ALB	34	628.691 50	0.712 50
ESR1	33	512.259 64	0.686 75
HSP90AA1	29	383.142 24	0.662 79
PTGS2	23	202.593 22	0.606 38
PRKCA	15	179.458 66	0.558 82
RXRA	15	168.161 39	0.548 08
CYP3A4	21	168.123 67	0.593 75
CREB1	21	151.086 17	0.593 75
PPARA	17	126.918 38	0.581 63
ACOX1	7	120.993 47	0.463 41

2.1.4 GO/KEGG 靶点功能及通路分析　将“2.1.2”项下 59 个交集基因上传至 DAVID 数据库，通过 GO 富集得到 193 个生物学过程、28 个细胞组分、71 个分子功能及 KEGG 通路 63 个，并利用微生信平台对 *P* 值排名前 10 的通路进行分析。GO 富集结果表明在生物学过程有跨上皮运输、细胞凋亡过程、细胞氧化解毒等；细胞组分有大分子复合物、核质、线粒体等；分子功能有外排跨膜转运蛋白活性、相同的蛋白质结合、氧化还原酶活性等；通过对 KEGG 通路富集筛选分析发现，衢枳壳黄酮干预 HCC 的通路主要有癌症通路、PPAR 信号通路、癌症 MicroRNA、PI3K-Akt 信号通路等。

2.1.5 成分-靶点-通路-疾病网络构建　根据“2.1.3”及“2.1.4”项下所得的 PPI 网络和 KEGG 通路分析结果，使用 Cytoscape 3.7.2 构建成分-靶点-通路-疾病网络，结果见图 2~4。

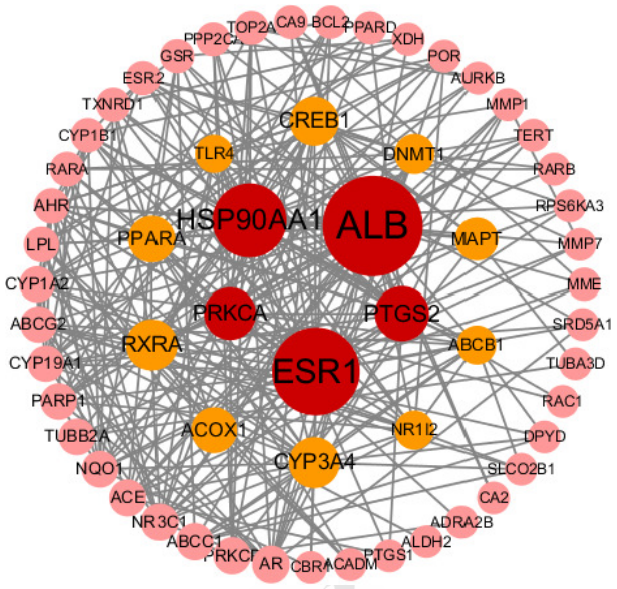

图 2 PPI 网络

根据 Betweenness 值排名将靶点划分为不同颜色类型，深红色为排名前 5 的核心靶点，橙色为排名 6~15 的关键靶点，粉色为排名 16 及之后的潜在靶点。

Fig. 2 PPI network

Targets are divided into different color types according to the Betweenness value ranking, with dark red being the top 5 core targets, orange being the key targets ranked 6−15, and pink being the potential targets ranked 16 and beyond.

2.2 细胞实验

2.2.1 IC_{50} 值　使用不同浓度衢枳壳黄酮处理，MTT 结果表明衢枳壳黄酮作用于 HepG2 细胞 24 h 的半数抑制浓度 IC_{50} 是 (1.10±0.05)mg·mL^{-1}，见图 5。

2.2.2 增殖活力　SRB 染色结果表明不同浓度的衢枳壳黄酮处理的细胞增殖活力在前 2 d 未表现出显著差异，在第 3 天开始表现出显著的浓度依赖型增殖抑制，见图 6。

2.2.3 克隆能力　结晶紫染色结果表明，随着衢枳壳黄酮浓度的增加，肝癌细胞的克隆活性均受到不同程度的抑制，并在≥0.250 mg·mL^{-1} 浓度与空白组差异具有统计学意义，见图 7。

2.2.4 划痕愈合能力　通过对 HepG2 细胞采取划痕创伤后给药衢枳壳黄酮，观察其对肝癌细胞的愈合能力影响；结果发现，与空白组相比，不同浓度的给药组 (0.125，0.250，0.500 mg·mL^{-1}) 在培养 24 h 后细胞愈合均受到显著抑制，见图 8。

2.2.5 Transwell 迁移活力　为观察衢枳壳黄酮对 HepG2 细胞的迁移活力影响采取了 Transwell 小室共培养；研究结果表明，与空白组相比，不同浓度的给药组 (0.125，0.250，0.500 mg·mL^{-1})

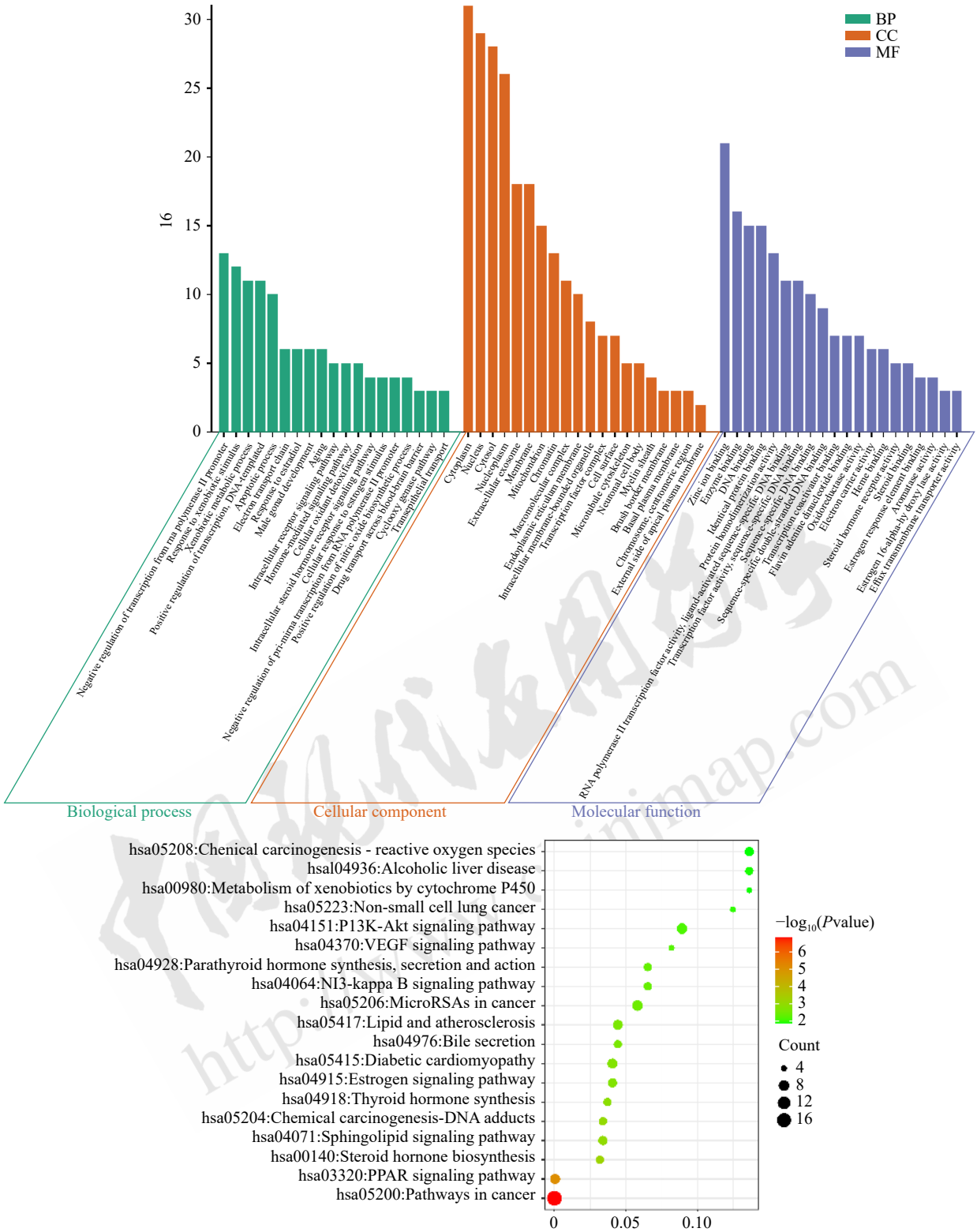

图 3 通路与功能富集气泡图

Fig. 3 KEGG pathway and GO functional enrichment bubble map

细胞迁移能力均受到显著抑制，见图 9。

2.2.6 Mito-Tracker Red/FITC-Annexin V 膜电位/凋亡共染 分别通过 Mito-Tracker Red CMXRos、Annexin V-FITC 与 Hoechst 33342 荧光标记观察 HepG2 在给药处理后的线粒体膜电位、凋亡表达与活细胞，结果发现，与空白组相比，高剂量组 (0.500 mg·mL^{-1}) 的凋亡表达增加，而低、中剂量组 (0.125，0.250 mg·mL^{-1}) 无明显差异；给药组细

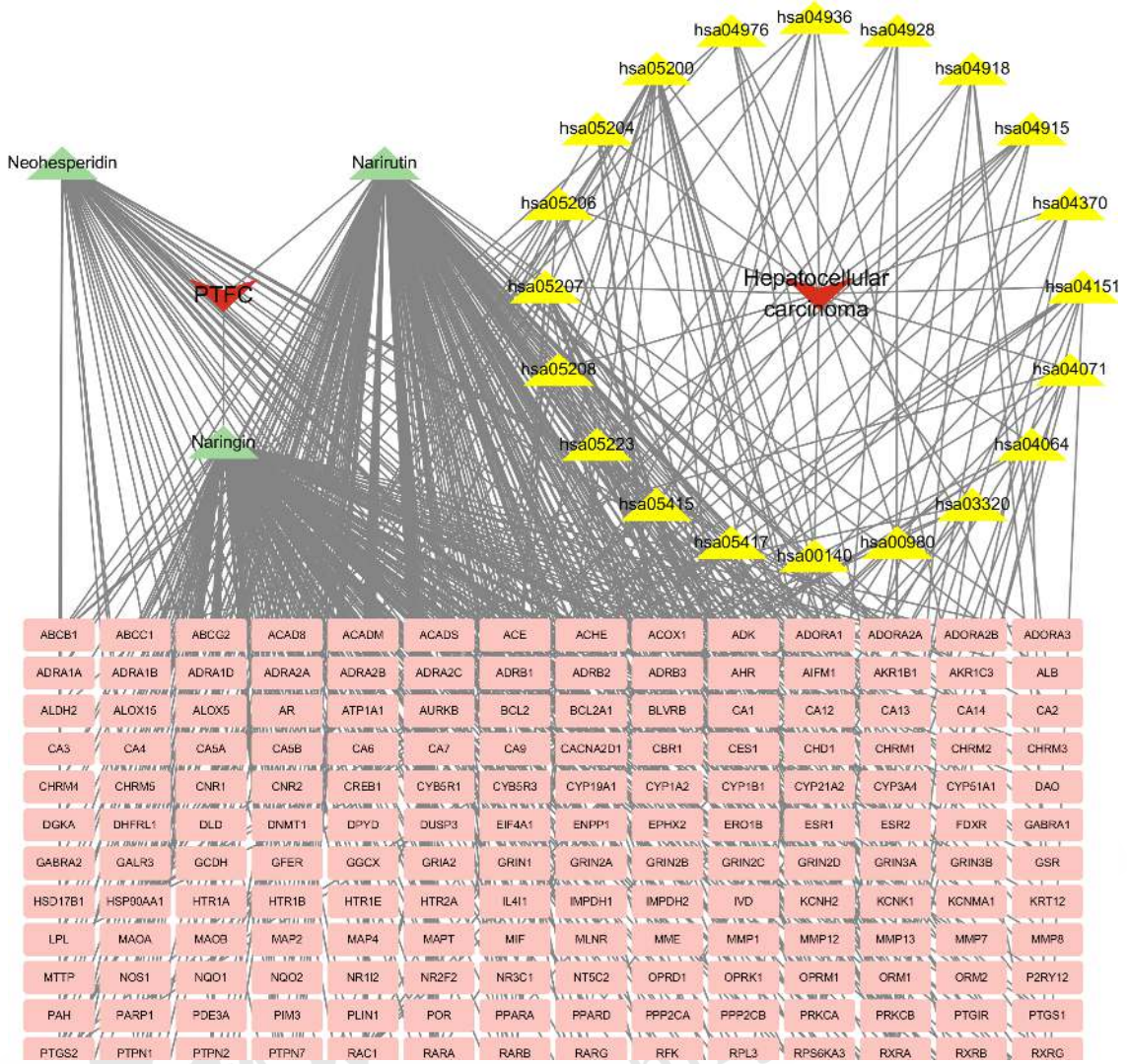

图 4 成分-靶点-通路-疾病网络

Fig. 4 Network of components-targets-pathways-diseases

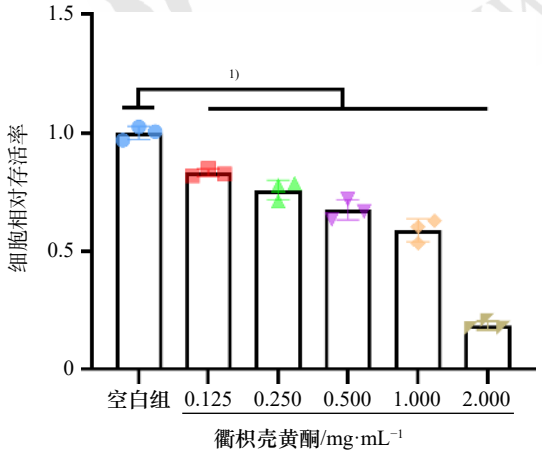

图5 HepG2 细胞在不同衢枳壳黄酮浓度下的存活率 ($\bar{x}\pm s$，n=3)

与空白组相比，[1]P<0.05。

Fig. 5 Survival rate of HepG2 cells at different concentrations of the flavonoids of Quzhou Fructus Aurantia ($\bar{x}\pm s$, n=3)

Compared with blank group, [1]P<0.05.

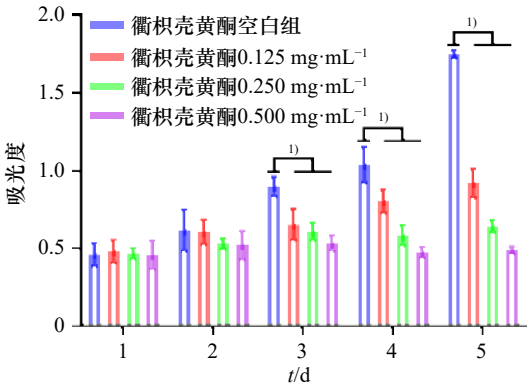

图 6 不同给药时间对 HepG2 细胞的增殖影响 ($\bar{x}\pm s$，n=3)

与空白组相比，[1]P<0.05。

Fig. 6 Effect of different administration time on proliferation of HepG2 cells($\bar{x}\pm s$, n=3)

Compared with blank group, [1]P<0.05.

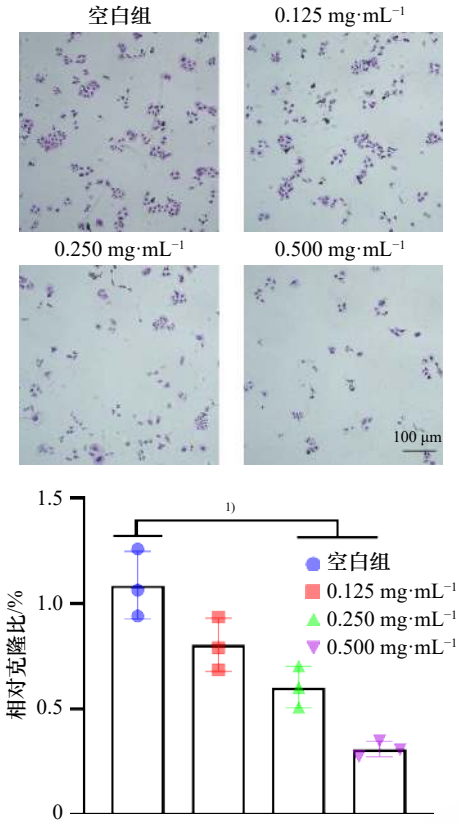

图 7 不同浓度的衢枳壳黄酮对 HepG2 细胞的克隆能力影响 ($\bar{x} \pm s$，n=3)

与空白组相比，[1)]P<0.05。

Fig. 7 Effects of different concentrations of the flavonoids of Quzhou Fructus Aurantia on the cloning ability of HepG2 cells($\bar{x} \pm s$, n=3)

Compared with blank group, [1)]P<0.05.

胞 (0.125，0.250，0.500 mg·mL^{-1}) 的线粒体膜电位随给药浓度增加而降低，见图 10。

2.2.7 RT-qPCR 试验 HepG2 细胞在不同浓度的衢枳壳黄酮处理后，PRKCA 基因 mRNA 表达水平显著降低，见图 11，相关引物序列见表 2。

3 讨论

衢枳壳又被称作“胡柚片”，它由常山胡柚的青果干燥、炮制而成，收录于新“浙八味”“衢六味”中药材品种培育目录，其药用历史可追溯至清代《衢州府志》，民间常用于治疗小儿肺炎等症。笔者所在课题组对衢枳壳的化学成分与药理活性进行了长期探索与研究[12]，发现衢枳壳的黄酮类物质具有抗炎[8]、抗氧化[9]等活性，参与肝-肠轴、脂质代谢[13]等生物进程进而调控肝病的发生发展。

衢枳壳黄酮提取物主要含有 3 种黄酮类成分，即柚皮苷、新橙皮苷、芸香柚皮苷。其中柚

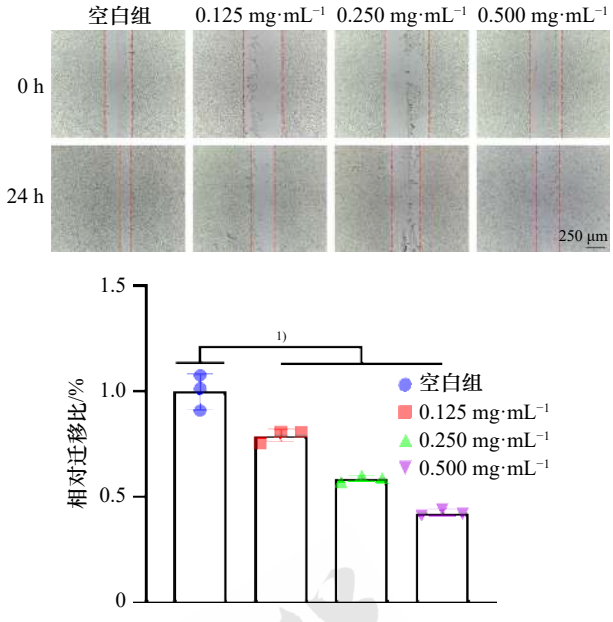

图 8 不同浓度的衢枳壳黄酮对 HepG2 细胞的愈合能力影响 ($\bar{x} \pm s$，n=3)

与空白组相比，[1)]P<0.05。

Fig. 8 Effects of different concentrations of the flavonoids of Quzhou Fructus Aurantia on healing ability of HepG2 cells ($\bar{x} \pm s$，n=3)

Compared with blank group, [1)]P<0.05.

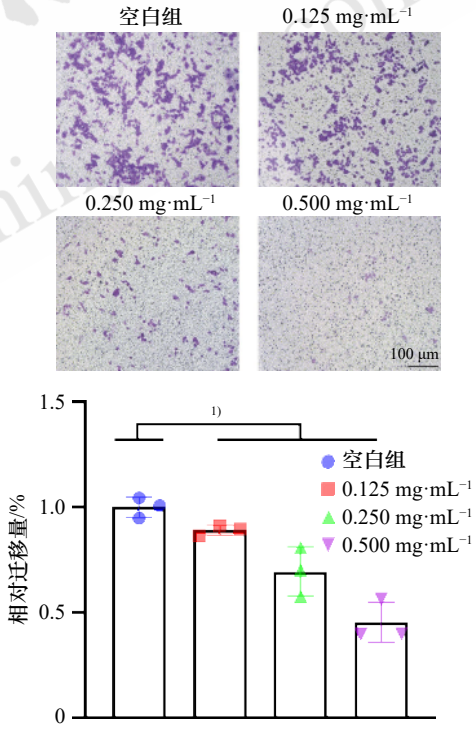

图 9 不同浓度的衢枳壳黄酮对 HepG2 细胞的迁移能力影响 ($\bar{x} \pm s$，n=3)

与空白组相比，[1)]P<0.05。

Fig. 9 Effects of different concentrations of the flavonoids of Quzhou Fructus Aurantia on migration ability of HepG2 cells ($\bar{x} \pm s$, n=3)

Compared with blank group, [1)]P<0.05.

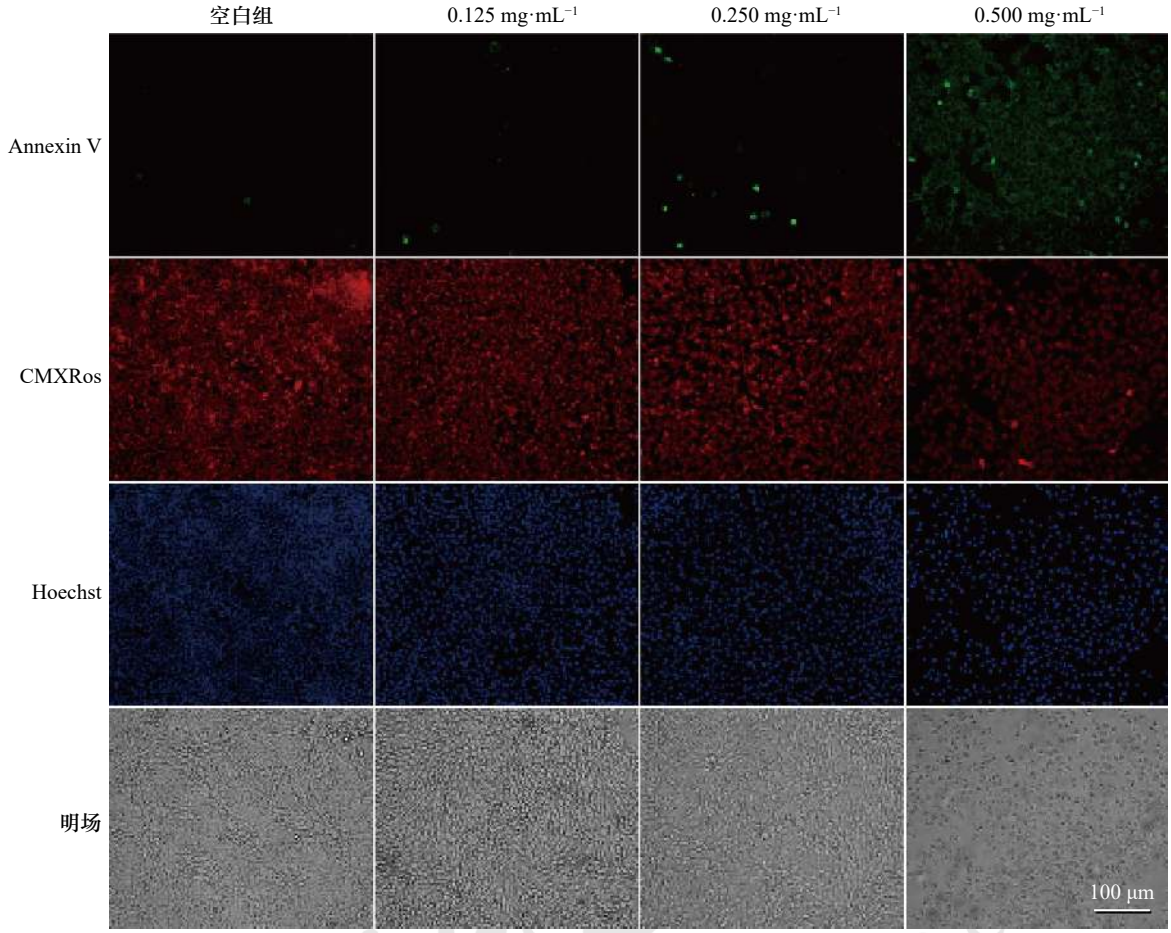

图 10 不同浓度衢枳壳黄酮对线粒体膜电位与凋亡表达的影响

Fig. 10 Effects of the flavonoids of Quzhou Fructus Aurantia at different concentrations on the mitochondrial membrane potential and expression of apoptosis

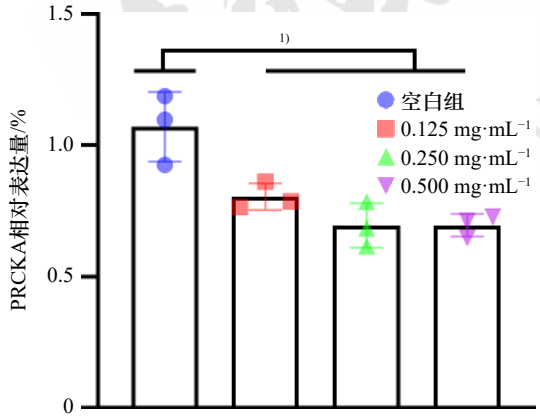

图 11 不同浓度衢枳壳黄酮干预对 PRKCA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$，n=3)

与空白组相比，[1)]P<0.05。

Fig. 11 Effects of different concentrations of the flavonoids of Quzhou Fructus Auranti on PRKCA expression($\bar{x} \pm s$，n=3)

Compared with blank group, [1)]P<0.05.

皮苷是一种相对安全、无毒的生物活性化合物，柚皮苷在肠道被微生物转化为其苷元形式，经历 I 相 (细胞色素 P450 单加氧酶的氧化或去甲基化) 和 II 相 (葡萄糖醛酸化、硫酸化或甲基化) 代谢[14]。已有研究证明其主要通过调控 PI3K/AKT、ERK 及活性氧等促进癌细胞凋亡与自噬，从而防治结直肠癌[15]、前列腺癌[16]、胃癌[17]、乳腺癌[18] 与肺癌[17]。此外，早期研究发现从胡柚果实中纯化得到柚皮苷和新橙皮苷能够干预 HepG2 细胞中葡萄糖消耗[19]，近年也有报道发现新橙皮苷能够通过激活人骨肉瘤细胞中的 ROS/JNK 途径引起 G2/M 期阻滞并诱导细胞凋亡和自噬，这表明新橙皮苷是一种潜在的多效治疗候选药物[20]。芸香柚皮苷是一种膳食黄酮，存在于多种芸香科植物中，具

表 2 引物序列设计

Tab. 2 Primer sequence design

名称		引物序列(5' to 3')	碱基数/bp
ACTB	For	GATGAGATTGGCATGGCTTT	20
	Rev	GTCACCTTCACCGTTCCAGT	20
PRKCA	For	TCATCAACTTAGGCGGTGAGT	21
	Rev	GTAAGGAGGACAGACAGGAGAG	22

有抗过敏、心脏保护、神经保护、肝脏保护的潜力，研究表明其能通过干预肿瘤细胞周期，抑制前列腺癌细胞的生长[21]。此外，它已被证实是一种有效的抗肺腺癌天然产物，可抑制肺腺癌中特异性高表达的分子靶点 TMEM16A[22]。本研究基于网络药理学，筛选衢枳壳主要黄酮成分的核心作用靶点，探讨衢枳壳干预 HCC 的分子作用机制。

本研究通过构建成分-靶点-通路-疾病网络预测了柚皮苷、芸香柚皮苷及新橙皮苷的潜在作用靶点。通过 GO 富集分析，发现衢枳壳黄酮可能通过影响核质、线粒体等细胞组分进而参与细胞凋亡过程、细胞氧化解毒等生物学过程；KEGG 靶点通路分析结果表明，前 20 条核心通路中有 13 条直接/间接系癌症相关通路，如癌症通路、癌症 MicroRNA、PI3K-Akt 信号通路等，说明其与衢枳壳黄酮治疗 HCC 的药效作用密切相关。

本研究采用增殖、克隆、愈合与迁移等癌细胞活力检测，发现衢枳壳黄酮能够显著抑制 HepG2 细胞的活力，并降低 HepG2 的线粒体膜电位、促进细胞凋亡。网络药理学结果表明衢枳壳黄酮对 PRKCA(即 PKCα) 具有潜在调节作用。PRKCA 是蛋白激酶 C 家族的 10 个成员之一，对包括 HCC 在内的多类型肿瘤细胞的侵袭、增殖和凋亡发挥重要作用[23-24]。PRKCA 已被证明在 HCC 患者中异常表达[25]，因此，针对 PRKCA 的基因表达情况进行检测，验证了网络药理学预测的衢枳壳黄酮对关键潜在靶点 PRKCA 的调控作用。

综上，本研究基于网络药理学及实验验证揭示了衢枳壳黄酮类成分抗 HCC 的潜在作用靶点。衢枳壳的药用开发潜力较大，未来研究团队将更多地从肿瘤微环境、肿瘤炎症、肠道菌群等多个方面探讨衢枳壳治疗 HCC 的药用价值，为临床衢枳壳防治 HCC 的应用与抗 HCC 的药物筛选提供科学支撑。

REFERENCES

[1] SUNG H, FERLAY J, SIEGEL R L, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA: Can J Clin, 2021, 71(3): 209-249.

[2] LLOVET J M, KELLEY R K, VILLANUEVA A, et al. Hepatocellular carcinoma[J]. Nat Rev Dis Prim, 2021, 7(1): 6.

[3] GOLABI P, PAIK J M, ALQAHTANI S, et al. Burden of non-alcoholic fatty liver disease in Asia, the Middle East and North Africa: Data from global burden of disease 2009-2019[J]. J Hepatol, 2021, 75(4): 795-809.

[4] AKINYEMIJU T, ABERA S, AHMED M, et al. The burden of primary liver cancer and underlying etiologies from 1990 to 2015 at the global, regional, and national level: Results from the global burden of disease study 2015[J]. JAMA Oncol, 2017, 3(12): 1683-1691.

[5] PARIKH N D, PILLAI A. Recent advances in hepatocellular carcinoma treatment[J]. Clin Gastroenterol Hepatol, 2021, 19(10): 2020-2024.

[6] Standard for diagnosis and treatment of primary liver cancer (2022 edition) [S]. 2022.

[7] HU Z Y, YANG Q R, ZHOU C, et al. Mechanism of chemotherapy resistance of hepatocellular carcinoma and intervention with Chinese medicine: A Review[J]. Chin J Experiment Tradit Med Form, 2022, 28(14): 254-261.

[8] JIANG J, YAN L, SHI Z, et al. Hepatoprotective and anti-inflammatory effects of total flavonoids of Qu Zhi Ke (peel of Citrus changshan-huyou) on non-alcoholic fatty liver disease in rats via modulation of NF-κB and MAPKs[J]. Phytomed, 2019, 64: 153082.

[9] SHI Z, LI T, LIU Y, et al. Hepatoprotective and anti-oxidative effects of total flavonoids from Qu Zhi Qiao (Fruit of Citrus Paradisi cv. Changshanhuyou) on nonalcoholic steatohepatitis *in vivo* and *in vitro* through Nrf2-ARE signaling pathway[J]. Front Pharmacol, 2020, 11: 483.

[10] BELLOCCO E, BARRECA D, LAGANà G, et al. Influence of L-rhamnosyl-D-glucosyl derivatives on properties and biological interaction of flavonoids[J]. Molecul Cell Biochem, 2009, 321(1-2): 165-171.

[11] JIANG J, SHAN L, CHEN Z, et al. Evaluation of antioxidant-associated efficacy of flavonoid extracts from a traditional Chinese medicine Hua Ju Hong (peels of *Citrus grandis* (L.) Osbeck)[J]. J Ethnopharmacol, 2014, 158 Pt A: 325-330.

[12] GAO L, ZHANG H, YUAN C H, et al. Citrus aurantium 'Changshan-huyou'-An ethnopharmacological and phytochemical review[J]. Front Pharmacol, 2022, 13: 983470.

[13] LING Y, SHI Z, YANG X, et al. Hypolipidemic effect of pure total flavonoids from peel of Citrus (PTFC) on hamsters of hyperlipidemia and its potential mechanism[J]. Exper Gerontol, 2020, 130: 110786.

[14] YANG Y, TREVETHAN M, WANG S, et al. Beneficial effects of citrus flavanones naringin and naringenin and their food sources on lipid metabolism: An update on bioavailability, pharmacokinetics, and mechanisms[J]. J Nutrit Biochem, 2022, 104: 108967.

[15] CHENG H, JIANG X, ZHANG Q, et al. Naringin inhibits colorectal cancer cell growth by repressing the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway[J]. Experiment Therapeut Med, 2020, 19(6): 3798-3804.

[16] ERDOGAN S, DOGANLAR O, DOGANLAR Z B, et al. Naringin sensitizes human prostate cancer cells to paclitaxel therapy[J]. Prost Internat, 2018, 6(4): 126-135.

[17] YAN L, CHEN H, XIE M. Synergic fabrication of naringin molecule into polymeric nanoparticles for the treatment and nursing care of lung cancer therapy[J]. J Polym Environ, 2021, 29: 4048-4059.

[18] LI H, YANG B, HUANG J, et al. Naringin inhibits growth potential of human triple-negative breast cancer cells by targeting β-catenin signaling pathway[J]. Toxicology, 2013, 220(3): 219-228.

[19] ZHANG J, SUN C, YAN Y, et al. Purification of naringin and neohesperidin from Huyou (Citrus changshanensis) fruit and their effects on glucose consumption in human HepG2 cells[J]. Food Chemist, 2012, 135(3): 1471-1478.

[20] WANG S, LI Z, LIU W, et al. Neohesperidin induces cell cycle arrest, apoptosis, and autophagy via the ros/jnk signaling pathway in human osteosarcoma cells[J]. Amer J Chin Med, 2021, 49(5): 1251-1274.

[21] SINGH S, MAURYA A K, MEENA A, et al. Narirutin. A flavonoid found in citrus fruits modulates cell cycle phases and inhibits the proliferation of hormone-refractory prostate cancer cells by targeting hyaluronidase[J]. Food Chem Toxicol, 2023, 174: 113638.

[22] SHI S, BAI X, JI Q, et al. Molecular mechanism of ion channel protein TMEM16A regulated by natural product of narirutin for lung cancer adjuvant treatment[J]. Internat J Biol Macromol, 2022, 223(Pt A): 1145-1157.

[23] O'NEILL A K, GALLEGOS L L, JUSTILIEN V, et al. Protein kinase Cα promotes cell migration through a PDZ-dependent interaction with its novel substrate discs large homolog 1 (DLG1)[J]. J Biol Chem, 2011, 286(50): 43559-43568.

[24] CHENG C Y, HSIEH H L, SUN C C, et al. IL-1 beta induces urokinase-plasminogen activator expression and cell migration through PKC alpha, JNK1/2, and NF-kappaB in A549 cells[J]. J Cell Physiol, 2009, 219(1): 183-193.

[25] XU L, HAZARD F K, ZMOOS A F, et al. Genomic analysis of fibrolamellar hepatocellular carcinoma[J]. Human Mol Genet, 2015, 24(1): 50-63.

收稿日期：2023-09-11
(本文责编：沈倩)

青年编委：蒋剑平

蒋剑平，医学博士，教授，浙江大学研究生导师、博士后合作导师，浙大城市学院附属医院党委委员、副院长，主要研究方向为肝病发病机制与中药药理学研究。2018 年入选浙江省高层次人才特殊支持计划 (万人计划) 青年拔尖人才，2020 年获评浙江省优秀中青年中医 (药) 师。现担任中华中医药学会中药临床药理分会副主任委员、中国中药协会中药产品开发与培育专业委员会常务委员、浙江省药学会科技开发工作委员会副主任委员、《中草药》和《中国现代应用药学》杂志青年编委。现主持国家自然科学基金面上项目、教育部重点项目及企业重大横向项目多项，发表学术论文 60 余篇，其中包括 *Accounts of Materials*(IF14.6)、*Phytomedicine* 等中科院一区杂志 SCI 论文 20 余篇，以第二完成人获 2014 年浙江省科技进步二等奖，以第一完成人获 2022 年中华中医药学会科学技术三等奖。

http://www.chinjmap.com