

基于网络药理学与 GC-MS 探讨竹叶花椒挥发油干预高脂血症的作用机制

唐宇恒¹, 陈琦¹, 江友娅², 高雪¹

1. 重庆工商大学 环境与资源学院, 重庆 400067

2. 重庆市天友乳业股份有限公司, 重庆 401120

摘要:目的 基于气相色谱-质谱联用结合网络药理学方法,探讨竹叶花椒挥发油干预高脂血症的活性成分及作用机制,为竹叶花椒挥发油中功能性成分研究及其干预高脂血症的作用机制提供理论基础。方法 首先通过 GC-MS 鉴定竹叶花椒挥发油的化学成分,再借助数据库获取化学成分对应靶点和高脂血症疾病靶点。又通过 Venn 图、蛋白-蛋白相互作用分析、GO 分析、KEGG 代谢通路富集分析和构建“靶点-通路-活性成分”网络得到竹叶花椒挥发油干预高脂血症的关键靶点。最后采用分子对接软件 AutoDock 对竹叶花椒挥发油主要活性化合物与关键靶点进行半柔性对接验证。结果 在竹叶花椒挥发油中鉴定出 29 个化学成分,得到 37 个干预高脂血症的核心靶点,该核心靶点涉及细胞对脂质的反应、脂质的定位调节和对脂多糖的反应等方面。KEGG 富集分析与“靶点-通路-活性成分”网络进一步得到 PPARA、RXRA、TNF、NR1H3、PPARG 和 IL-6 等 28 个关键靶点,也得到金合欢醇、亚油酸和 α -石竹烯等 7 个主要活性成分。分子对接结果表明关键靶点与主要活性成分有较好的结合能力,结合能均小于 -7.0 kJ/mol。结论 竹叶花椒挥发油中的多种功能性成分可能通过作用关键靶点 PPARA、RXRA、TNF、NR1H3、PPARG 和 IL-6 以起到干预高脂血症的作用。本研究探讨了竹叶花椒挥发油干预高脂血症的作用机制,期望为竹叶花椒挥发油中功能性成分的进一步研究提供理论支撑。

关键词: 竹叶花椒挥发油;网络药理学;气相色谱-质谱联用;高脂血症

中图分类号:TS201.4 文献标识码:A doi:10.16055/j.issn.1672-058X.2024.0003.005

Investigation of the Mechanism of Volatile Oil from *Zanthoxylum Armatum* DC. in Intervening Hyperlipidemia Based on Network Pharmacology and GC-MS

TANG Yuheng¹, CHEN Qi¹, JIANG Youya², GAO Xue¹

1. School of Environmental and Resources, Chongqing Technology and Business University, Chongqing 400067, China

2. Chongqing Tianyou Dairy Co., Ltd., Chongqing 401120, China

Abstract: Objective Based on gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) combined with network pharmacology methods, this study explored the active ingredients and mechanisms of the volatile oil from *Zanthoxylum armatum* DC. in intervening hyperlipidemia, providing a theoretical basis for the research on functional components in the volatile oil from *Zanthoxylum armatum* DC. and its intervention mechanism in hyperlipidemia. **Methods** Initially, the chemical components of the volatile oil from *Zanthoxylum armatum* DC. were identified by GC-MS, and then the corresponding targets of the chemical components and the disease targets of hyperlipidemia were obtained through databases. The key targets of the volatile oil from *Zanthoxylum armatum* DC. in intervening hyperlipidemia were obtained through Venn diagram, protein-protein interaction analysis, GO analysis, KEGG metabolic pathway enrichment analysis, and

收稿日期:2023-04-04 修回日期:2023-05-06 文章编号:1672-058X(2024)03-0033-10

基金项目:重庆工商大学科学研究项目(2152005)。

作者简介:唐宇恒(1998—),男,四川渠县人,硕士研究生,从事食品化学与营养学研究。Email:1250293119@qq.com.

通讯作者:高雪(1980—),女,重庆南岸人,博士,研究员,从事天然产物研究与开发研究。Email:gaoxue@ctbu.edu.cn.

引用格式:唐宇恒,陈琦,江友娅,等.基于网络药理学与 GC-MS 探讨竹叶花椒挥发油干预高脂血症的作用机制[J].重庆工商大学学报(自然科学版),2024,41(3):33—42.

TANG Yuheng, CHEN Qi, JIANG Youya, et al. Investigation of the mechanism of volatile oil from *Aanthoxylum armatum* DC. in intervening hyperlipidemia based on network pharmacology and GC-MS[J]. Journal of Chongqing Technology and Business University (Natural Science Edition), 2024, 41(3): 33—42.

construction of the “target-pathway-active ingredient” network. Finally, the molecular docking software AutoDock was used to validate the semi-flexible docking of the main active compounds from the volatile oil from *Zanthoxylum armatum* DC. with the key targets. **Results** 29 chemical components were identified in the volatile oil from *Zanthoxylum armatum* DC., obtaining 37 core targets for intervening hyperlipidemia, which are involved in cellular responses to lipids, lipid localization regulation, and responses to lipopolysaccharides. Through KEGG enrichment analysis and the “target-pathway-active ingredient” network, 28 key targets including PPARG, RXRA, TNF, NR1H3, PPARG, and IL-6, as well as 7 main active ingredients such as farnesol, linoleic acid, and α -caryophyllene were obtained. The molecular docking results showed that the key targets had good binding abilities with the main active ingredients, with binding energies all less than -7.0 kJ/mol. **Conclusion** Various functional components in the volatile oil from *Zanthoxylum armatum* DC. may intervene hyperlipidemia by acting on key targets such as PPARG, RXRA, TNF, NR1H3, PPARG, and IL-6. This study explores the mechanism of the volatile oil from *Zanthoxylum armatum* DC. in intervening hyperlipidemia, aiming to provide theoretical support for further research on the functional components in the volatile oil from *Zanthoxylum armatum* DC.

Keywords: volatile oil from *Zanthoxylum armatum* DC.; network pharmacology; gas chromatography-mass spectrometry; hyperlipidemia

1 引言

据报道,高脂血症(Hyperlipidemia)的发病率逐年升高^[1]。此外,高脂血症还会引发冠心病、动脉粥样硬化和心血管堵塞等多种并发症^[2],严重威胁人类健康。从药食两用食材中寻找具有血脂调节作用的功能性成分是当今的热点,比如生姜中的抗性淀粉能显著降低高脂血症大鼠血清中的甘油三酯和总胆固醇水平^[3],姬松茸中的多糖可能影响老鼠体内生理代谢而起到降血脂的作用^[4]。

竹叶花椒(*Zanthoxylum armatum* DC.)为芸香科(Rutaceae)花椒属(*Zanthoxylum*)植物^[5],多见于我国西南地区云南、四川和重庆,俗名有“青花椒、藤椒、九叶青、蜀椒”等。竹叶花椒是川渝饮食习俗中不可或缺的元素,其果皮有着特殊的麻香风味而被用作除腥增香的必需调味品,其果皮里的花椒籽也可作为食用油的原料^[6]。竹叶花椒不仅是食品,还具有药用价值,可治疗腹泻、牙痛和风湿疼痛等症状^[7-8]。

近年来,竹叶花椒的功能性研究备受关注,2021年,Dahal等^[9]发现竹叶花椒果实正己烷提取物与阿卡波糖对 α -淀粉酶的半抑制浓度比较接近。同样,Rynjah等^[10]对血糖正常的小鼠和糖尿病模型小鼠摄入适量竹叶花椒叶的水提物一段时间后,发现两组小鼠体内的血糖值均明显降低,这说明竹叶花椒有抗糖尿病作用。另外,Alam等^[11]饲喂小鼠竹叶花椒果实、树皮和叶子的甲醇提取物一段时间后,与未饲喂提取物小鼠的血清生化参数相比,发现体内总胆固醇水平、三酰甘油水平和低密度脂蛋白水平明显下降,这说明竹叶花椒具有降低血脂的功能。最新的研究表明,采用水蒸馏法得到的竹叶花椒精油喂养大鼠一段时间后,与水喂养组相比,精油喂养组体内的三酰甘油、血糖值、总胆固醇值和低密度脂蛋白水平均有所下降^[12-13]。由此可见,竹叶花椒是值得开发利用的植物资源,而对于竹叶花椒挥发油干预高脂血症

的功能来说,其物质基础和作用机制尚不明确。因此,有必要对竹叶花椒挥发油干预高脂血症的功能性成分及其作用机制进行深入研究。

气相色谱-质谱联用(GC-MS)可对组分复杂的竹叶花椒挥发油给予精准的定性定量分析。网络药理学因系统分析疾病、化合物与靶点间复杂的相互作用关系而具有多元结合性和综合分析性的优点^[14]。本研究结合GC-MS与网络药理学,探讨竹叶花椒挥发油活性成分干预高脂血症的作用靶点及代谢信号通路,挖掘竹叶花椒挥发油潜在的干预高脂血症的作用机制,为竹叶花椒挥发油功能性成分的深入研究提供更多理论依据。

2 材料与仪器

2.1 材料

CO₂超临界萃取的竹叶花椒果皮挥发油,来自重庆华翠生物科技有限公司。

2.2 仪器

气相色谱-质谱联用仪,产自日本岛津公司,型号为GC-MS-QP2010。

3 方法

3.1 竹叶花椒挥发油的GC-MS分析

3.1.1 气相色谱条件

Rtx-5MS色谱柱(30 m×0.25 mm,0.2 μ m),初温80℃下保持3 min,以15℃/min的速率升至280℃并保持14 min再进样。载气为1 mL/min的氦气。进样量0.1 μ L,不分流。

3.1.2 质谱条件

电离能量70 eV,离子源温度200℃的电子轰击离子源,扫描范围为m/z 41~520。

3.2 竹叶花椒挥发油GC-MS化学成分作用靶点收集

定性竹叶花椒挥发油化学成分信息后,在TCMSP数据库(<https://tcmsp-e.com>)检索并收集化学成分所对应

的靶点,如 TCMS 未见其化学成分对应靶点,则在 PubChem 数据库(<https://pubchem.gov/>)和 Swiss Target Prediction 数据库(<http://www.swisstargetprediction.ch/>)中进行靶点补充。

3.3 高脂血症疾病靶点收集及交集靶点

在 GeneCards 数据库(<https://www.genecards.org/>)中,以“hyperlipidemia”为关键词收集疾病靶点(筛选条件为 Relevance score ≥ 1),又在 OMIM 数据库(<https://omim.org/>)中,以“hyperlipidemia”为关键词收集疾病靶点,然后将两数据库中的疾病靶点去重复、去假阳性并整理合并得到高脂血症疾病靶点。对化学成分对应靶点与高脂血症疾病靶点取交集,并通过 Venn 图进行可视化。

3.4 蛋白-蛋白相互作用关系及核心靶点

交集靶点导入 STRING 数据库(<https://cn.string-db.org/>),设置物种为人类蛋白靶点,获得蛋白相互作用关系,可视化与分析借助 Cytoscape 3.9.1 软件进行,核心靶点筛选的要求为中介中心性指数和接近中心性指数均大于各数据的中位数^[15]。

3.5 GO 分析及 KEGG 代谢通路富集分析

核心靶点导入 Metascape 数据库(<https://metascape.org/>),设置物种为人类蛋白靶点,进行 GO 分析及 KEGG 代谢通路富集分析,并将结果可视化。

3.6 “靶点-通路-活性成分”网络构建及筛选关键靶点

根据 KEGG 代谢通路富集结果,导入代谢通路、关联化合物和核心靶点于 Cytoscape 3.9.1 软件,构建“化合物-通路-靶点”网络图并根据每个化合物的度值由高到低筛选出干预高脂血症的关键靶点。

3.7 分子对接验证

在 PDB 数据库(<https://www.rcsb.org/>)下载过氧化物酶体增值物激活受体 α(PPARA)、视黄醇 X 受体 α(RXRA)、肿瘤坏死因子(TNF)、氧甾醇受体 α(NR1H3)、过氧化物酶体增值物激活受体 γ(PPARG)和白细胞介素-6(IL-6)关键靶点蛋白的晶体复合物。再借助 PubChem 数据库和 Chem 3D 软件对接的主要活性成分、阳性对照进行对接前处理。用软件 AutoDock 与分子对接程序 AutoDock Vina 进行分子对接。

4 结 果

4.1 竹叶花椒挥发油化学成分的 GC-MS 分析

如表 1 所示,所得化合物质谱数据通过与 GC-MS 数据库 NIST17s.LIB 数据匹配并结合文献资料,鉴定出酯类成分 6 个,醇类成分 8 个,烯炔类成分 15 个,其它未知成分 8 个,总计 37 个。其中芳樟醇占比最高,为 46.23%,3-亚甲基-6-(1-甲基乙基)环己烯和柠檬烯占比较高,分别为 4.73%和 3.14%。

表 1 竹叶花椒挥发油 GC-MS 分析结果
Table 1 The GC-MS analysis results of Zanthoxylum armatum DC. volatile oil

编 号	tR/min	占比/%	English Name	中文名	CAS 号
ZA1	4.484	1.72	Sabinene	桉烯	3387-41-5
ZA2	4.645	0.34	β-Myrcene	月桂烯	123-35-3
ZA3	5.274	3.14	D-Limonene	柠檬烯	138-86-3
ZA4	6.202	46.23	β-Linalool	芳樟醇	78-70-6
ZA5	7.914	0.43	Linalyl acetate	乙酸芳樟酯	115-95-7
ZA6	10.335	0.34	Germacrene D	吉马烯	23986-74-5
ZA7	13.634	0.28	β-Elemene	β-榄香烯	515-13-9
ZA8	13.792	0.42	Copaene	胡椒烯	18252-44-3
ZA9	13.938	4.73	3-methylene-6-(1-methylethyl)-Cyclohexene	3-亚甲基-6-(1-甲基乙基)环己烯	555-10-2
ZA10	13.977	0.13	—	—	—
ZA11	14.417	0.31	Bicyclo[3.1.0]hexan-2-ol,2-methyl-5-(1-methylethyl)-cis-sabinenhydrate	4-侧柏醇	546-79-2
ZA12	14.583	0.23	—	—	—
ZA13	14.701	0.45	α-Caryophyllene	α-石竹烯	6753-98-6
ZA14	14.867	0.46	3,6,6-trimethyl-bicyclo(3.1.1) hept-2-ene	3,6,6-三甲基-双环(3.1.1)庚-2-烯	4889-83-2
ZA15	14.934	0.56	Tricyclene	无	508-32-7
ZA16	15.051	1.11	Cineole	桉叶油醇	470-82-6
ZA17	15.190	1.09	Caryophyllene	三甲基-8-亚甲基-二环[7.2.0]4-十一烯	118-65-0
ZA18	15.237	2.14	Methyl palmitoleate	(Z)-十六烯酸甲酯	1120-25-8
ZA19	15.343	1.27	Aromadendrene	香橙烯	489-39-4
ZA20	15.703	4.42	4-Carvomenthenol	4-萜烯醇	562-74-3
ZA21	15.744	3.16	Terpinolene	萜品油烯	586-62-9

续表(表1)

编 号	tR/min	占比/%	English Name	中文名	CAS 号
ZA22	15.842	3.69	γ -Terpinene	γ -萜品烯	99-85-4
ZA23	15.927	3.77	β -ocimene	罗勒烯	13877-91-3
ZA24	16.017	5.88	Myrcenol	月桂烯醇	543-39-5
ZA25	16.077	1.37	α -Terpineol	α -松油醇	98-55-5
ZA26	16.151	3.93	α -Ocimene	罗勒烯	502-99-8
ZA27	16.328	1.03	Geraniol	香叶醇	106-24-1
ZA28	16.475	0.1	—	—	—
ZA29	16.550	0.39	α -phellandrene	α -水芹烯	99-83-2
ZA30	16.617	0.23	α -Pinene	α -蒎烯	80-56-8
ZA31	16.650	0.11	—	—	—
ZA32	16.742	0.32	Methyl phenylacetate	苯乙酸甲酯	101-41-7
ZA33	16.833	0.47	Isobutyl acetate	乙酸异丁酯	110-19-0
ZA34	16.875	0.13	—	—	—
ZA35	17.047	0.09	—	—	—
ZA36	17.206	0.59	(E,E)-Farnesol	金合欢醇	106-28-5
ZA37	17.360	0.53	Undecanal	十一醛	112-44-7
ZA38	17.413	0.23	Myrtenal	桃金娘烯醛	564-94-3
ZA39	17.545	0.37	Hexadecenoic acid	棕榈油酸	373-49-9
ZA40	17.725	0.21	Linoleic acid	亚油酸	60-33-3
ZA41	17.817	0.13	Heptadecane	十七烷	629-78-7
ZA42	17.924	0.27	—	—	—
ZA43	18.050	0.18	—	—	—
ZA44	18.217	0.27	—	—	—
ZA45	18.392	0.25	—	—	—
ZA46	20.502	0.39	—	—	—
ZA47	20.944	1.57	Isobornyl acetate	乙酸异龙脑酯	125-12-2
ZA48	21.337	0.11	—	—	—
ZA49	21.616	0.22	—	—	—
ZA50	25.796	0.21	Dibutyl phthalate	邻苯二甲酸二丁酯	84-74-2

注:“—”代表未鉴定出

4.2 化合物靶点与疾病靶点交集

如图 1 所示,将 536 个化合物靶点与 713 个高脂血症疾病靶点取交集,得到与高脂血症有关的交集靶点 81 个。

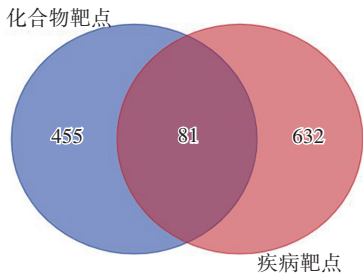


图 1 化合物靶点与疾病靶点的 Venn 图

Fig. 1 The Venn diagram of compound targets and disease targets

4.3 蛋白相互作用可视化及核心靶点获取

如图 2 所示,在 Cytoscape 3.9.1 中可观察到该网络度值中位数为 14,中介中心性中位数为 0.983,接近中心性中位数为 0.519,则筛选出 37 个核心靶点,主要包含血清蛋白(ALB)、白细胞介素-6(IL-6)、肿瘤坏死

因子(TNF)、过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (PPARG)等等。提示这些靶点可能在干预高脂血症中发挥了重要作用。

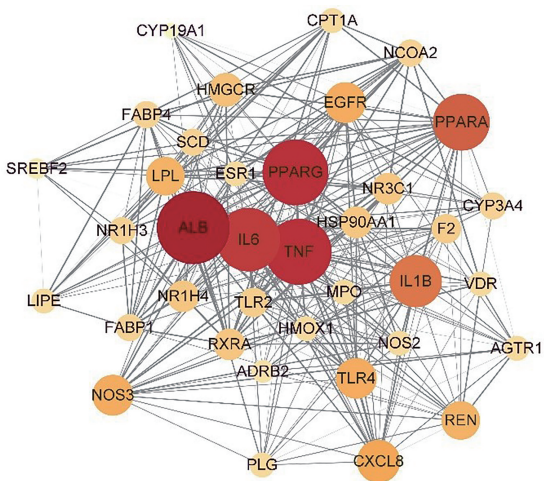


图 2 竹叶花椒挥发油治疗高脂血症核心靶点的相互作用关系
Fig. 2 The important targets' protein-protein interaction of Zanthoxylum armatum DC. volatile oil treating hyperlipidemia

4.4 GO 分析结果

使用 Metascope 数据库对筛选的核心靶点进行 GO 富集分析,共获得 651 个涉及 Biological Processes,22 个涉及 Cellular Components, 50 个涉及 Molecular Functions,该 723 个条目的 *P* 值均小于 0.01,以 Log *P* 值为指标选取相关性最强的前 15 个条目进行可视化,结果如图 3 所示。生物过程显示,竹叶花椒挥发油干预高脂血症的核心靶点主要与细胞对脂质的反应、脂

质的定位调节、炎症反应的调节、细胞分泌调节、对脂多糖的反应、激素水平调节等有关;细胞组分结果显示,竹叶花椒挥发油可能作用于受体复合物、膜筏、囊泡腔和细胞质泡腔等细胞内、胞外区、细胞外空间等,从而发挥干预高脂血症的作用;分子功能结果显示,竹叶花椒挥发油发挥干预高脂血症的作用主要与核受体活性、配体活化转录因子活性、类固醇结合、有机酸结合、羧酸结合和血红素结合等方面相关。

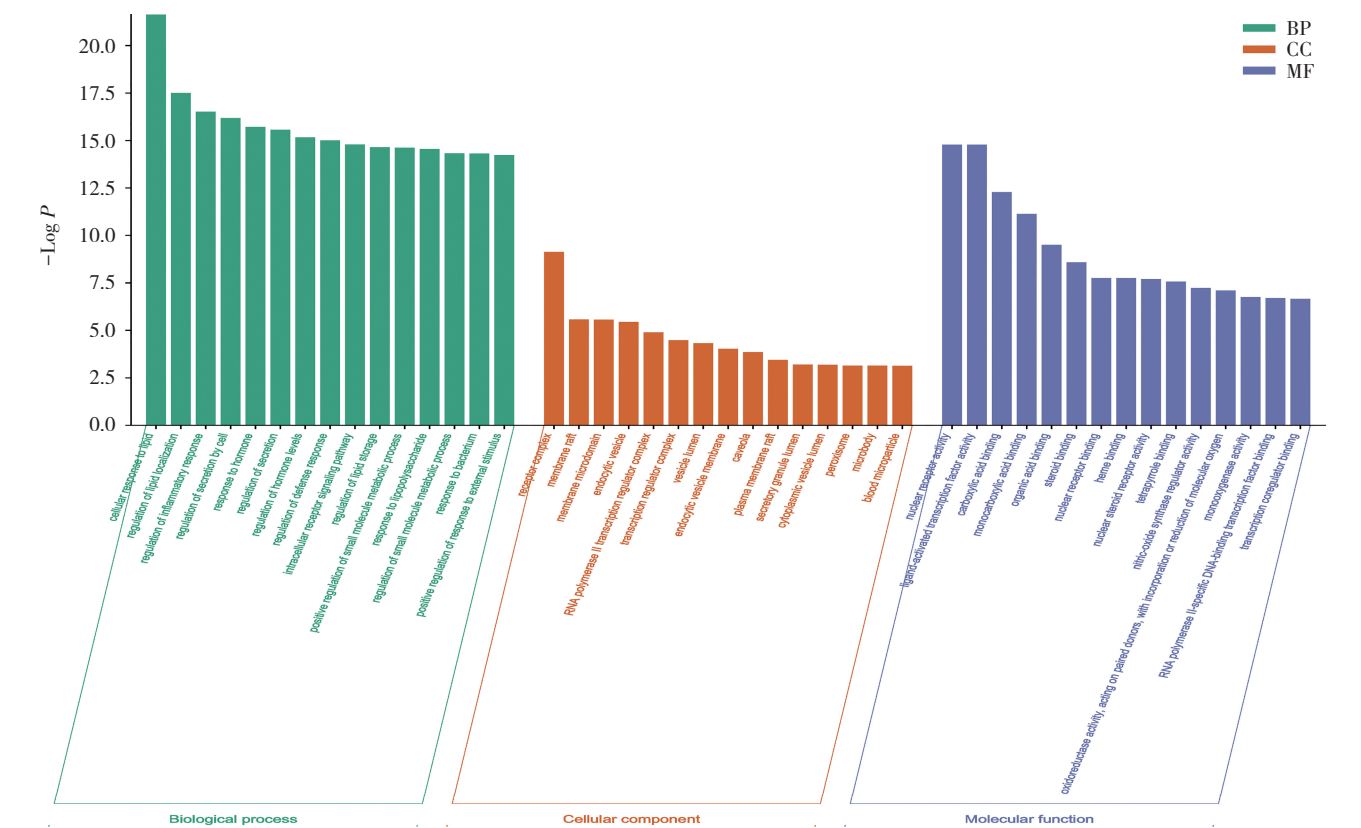


图 3 竹叶花椒治疗高脂血症核心靶点的 GO 富集分析(前 15)

Fig. 3 The important targets' GO enrichment analysis of *Zanthoxylum armatum* DC. volatile oil treating hyperlipidemia (top 15)

4.5 KEGG 代谢通路富集分析结果

如图 4 所示,共筛得 75 条信号通路,选取 *P* 值较小的前 20 条通路进行可视化。*P* 值代表富集靶点的显著性,*P* 值越小,颜色越红;*P* 值越大,颜色越绿。竹叶花椒挥发油干预高脂血症的机制主要与 PPAR 信号通路、脂质与动脉粥样硬化、酒精性肝病、非酒精性脂肪肝、癌症的途径、糖尿病并发症中的 AGE-RAGE 信号通路、胰岛素拮抗等信号通路有关。

对 37 个核心靶点的 KEGG 代谢通路进行富集,共

筛选得到 75 条信号通路(*P*<0.01),涉及 PPAR 信号通路(hsa03320)、脂质与动脉粥样硬化(hsa05417)、酒精性肝病(hsa04936)、非酒精性脂肪肝(hsa04932)、胰岛素拮抗(hsa04931)和糖尿病并发症中的 AGE-RAGE 信号通路(hsa04933)等相关通路。*P* 值较小的前 20 条相关 KEGG 代谢通路对应靶点信息如表 2 所示,视之为竹叶花椒挥发油干预高脂血症的关键代谢通路。将匹配靶点去重复并与 3.2 进行比对分析,得到关键靶点 28 个,活性成分 32 个。

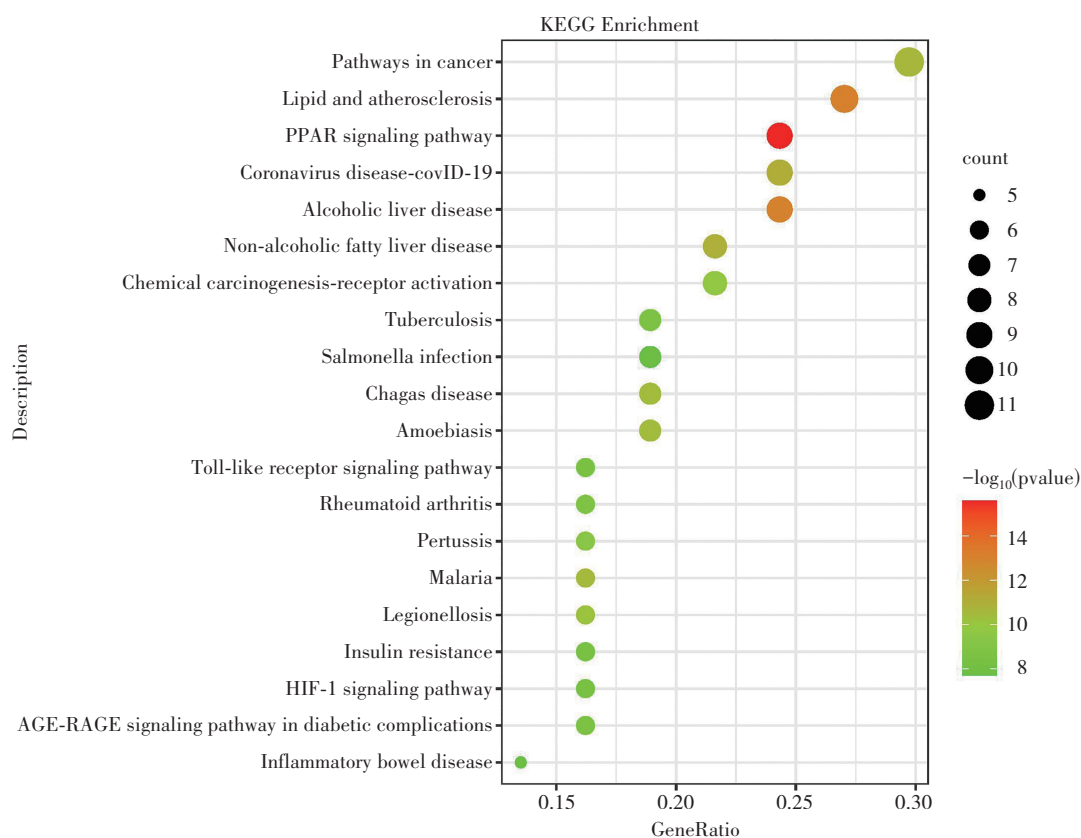


图 4 竹叶花椒挥发油治疗高脂血症核心靶点 KEGG 富集分析(前 20)

Fig. 4 The important targets' KEGG enrichment analysis of *Zanthoxylum armatum* DC. volatile oil treating hyperlipidemia (top 20)

表 2 代谢通路对应靶点信息

Table 2 The information of metabolism pathways and related targets

通 路	P 值	匹配靶点
hsa03320: PPAR signaling pathway	2.58×10^{-16}	CPT1A, FABP4, FABP1, LPL, PPARG, RXRA, SCD, NR1H3
hsa05417: Lipid and atherosclerosis	8.03×10^{-14}	HSP90AA1, IL1B, IL6, CXCL8, NOS3, PPARG, RXRA, TLR2, TLR4, TNF
hsa04936: Alcoholic liver disease	9.72×10^{-14}	CPT1A, FABP1, IL1B, IL6, CXCL8, PPARG, SCD, TLR4, TNF
hsa05171: Coronavirus disease - COVID-19	8.27×10^{-12}	AGTR1, EGFR, F2, IL1B, IL6, CXCL8, TLR2, TLR4, TNF
hsa04932: Non-alcoholic fatty liver disease	1.37×10^{-11}	IL1B, IL6, CXCL8, PPARG, RXRA, TNF, NR1H3
hsa05200: Pathways in cancer	2.55×10^{-11}	AGTR1, EGFR, ESR1, F2, HMOX1, HSP90AA1, IL6, CXCL8, NOS2, PPARG, RXRA
hsa05144: Malaria	3.39×10^{-11}	IL1B, IL6, CXCL8, TLR2, TLR4, TNF
hsa05142: Chagas disease	3.87×10^{-11}	IL1B, IL6, CXCL8, NOS2, TLR2, TLR4, TNF
hsa05146: Amoebiasis	3.87×10^{-11}	IL1B, IL6, CXCL8, NOS2, TLR2, TLR4, TNF
hsa05134: Legionellosis	7.69×10^{-11}	IL1B, IL6, CXCL8, TLR2, TLR4, TNF
hsa05207: Chemical carcinogenesis - receptor activation	1.68×10^{-10}	ADRB2, CYP3A4, EGFR, ESR1, HSP90AA1, PPARG, RXRA, VDR
hsa05133: Pertussis	4.55×10^{-10}	IL1B, IL6, CXCL8, NOS2, TLR4, TNF
hsa05323: Rheumatoid arthritis	1.56×10^{-9}	IL1B, IL6, CXCL8, TLR2, TLR4, TNF
hsa05152: Tuberculosis	2.11×10^{-9}	IL1B, IL6, NOS2, TLR2, TLR4, TNF, VDR
hsa04933: AGE-RAGE signaling pathway in diabetic complications	2.43×10^{-9}	AGTR1, IL1B, IL6, CXCL8, NOS3, TNF

续表(表2)

通 路	P 值	匹配靶点
hsa04620: Toll-like receptor signaling pathway	3. 08×10 ⁻⁹	IL1B、IL6、CXCL8、TLR2、TLR4、TNF
hsa04931: Insulin resistance	3. 87×10 ⁻⁹	CPT1A、IL6、NOS3、PPARA、TNF、NR1H3
hsa04066: HIF-1 signaling pathway	4. 10×10 ⁻⁹	EGFR、HMOX1、IL6、NOS2、NOS3、TLR4
hsa05321: Inflammatory bowel disease	1. 64×10 ⁻⁸	IL1B、IL6、TLR2、TLR4、TNF
hsa05132: Salmonella infection	1. 99×10 ⁻⁸	HSP90AA1、IL1B、IL6、CXCL8、TLR2、TLR4、TNF

4.6 “靶点-通路-活性成分”网络的构建

将 28 个关键靶点、前 20 条代谢通路和 32 个活性成分导入 Cytoscape 软件并做调整,如图 5 所示,该节点红色圆形、黄色三角和蓝色方块分别代表匹配靶点、代谢通路和活性成分,并按照处理,度值越大,图形面积越大;度值越小,图形面积越小。度值越大,表示该节点在网络中重要性越大。由图可推测出活性成分 ZA36、ZA40、ZA13、ZA6、ZA9、ZA14、ZA30 与靶点 PPARA、RXRA、TNF、NR1H3、PPARG、IL-6 在干预高脂血症中发挥的作用相比其他活性成分和其他关键靶点更大。

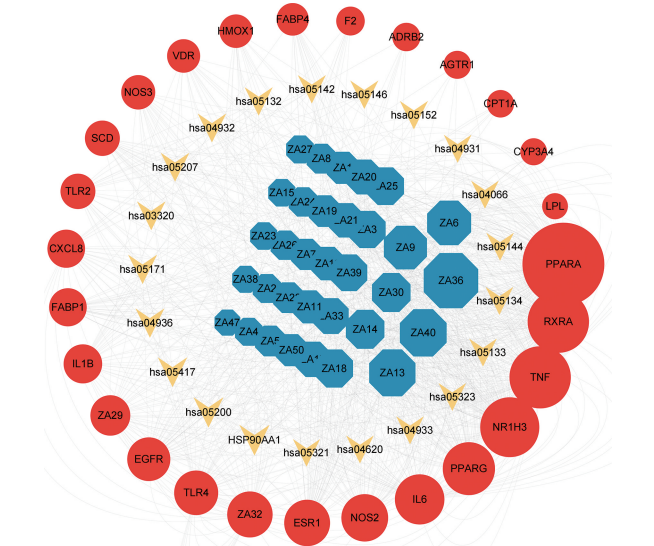


图 5 竹叶花椒挥发油干预高脂血症的靶点-通路-活性成分网络
Fig. 5 The targets-pathway-active compounds nets of *Zanthoxylum armatum* DC. volatile oil intervening hyperlipidemia

4.7 竹叶花椒挥发油中活性成分的分子对接验证

为验证竹叶花椒挥发油活性成分与高脂血症关键靶点间的相互作用,并考虑到挥发油中量大化合物的应用开发,将筛选“靶点-通路-活性成分”网络中 7 个度值排名靠前的活性成分、GC-MS 鉴定的量大化合物和 2 种临床阳性对照药物阿托伐他汀、辛伐他汀与 6 个度值靠前的代表关键靶点 (PPARA、RXRA、TNF、NR1H3、PPARG、IL-6) 进行分子对接。结果如表 3 所示,图 6 所示所示,7 个活性成分与 6 个关键靶点的结合能均小于-5.7 kJ/mol,其中金合欢醇(ZA36)和亚油

酸(ZA40)与 PPARA、RXRA、TNF、NR1H3、PPARG 和 IL-6 的结合能均小于-7.0 kJ/mol^[16],且配体与受体存在多个氢键结合位点。当结合能小于-5.0 kJ/mol 表示配体与受体具有较强的结合能力,由此说明该 7 个活性成分与这 6 个关键靶点有较强的结合能力。

表 3 竹叶花椒挥发油活性成分与关键靶点的结合能
Table 3 The binding energy of *Zanthoxylum armatum* DC. volatile oil active compounds with the key targets

活性成分	结合能/(kJ·mol ⁻¹)					
	PPARA	RXRA	TNF	NR1H3	PPARG	IL-6
ZA36	-9.5	-10.6	-8.1	-11.4	-11.6	-7.9
ZA40	-7.4	-8.6	-7.9	-8.6	-9.4	-7.1
ZA13	-9.7	-10.3	-8.8	-11.2	-10.9	-9.4
ZA6	-8.2	-8.8	-7.6	-9.6	-10.5	-7.3
ZA9	-7.1	-7.5	-6.8	-7.7	-6.6	-5.5
ZA14	-6.3	-6.9	-6.1	-7.7	-7.0	-6.4
ZA30	-7.0	-6.2	-5.7	-7.3	-6.3	-7.2
Limonene	-3.1	-4.2	-5.5	-1.6	-2.0	-3.2
Linalool	-3.4	-1.9	-3.0	-2.5	-2.7	-3.1
Atorvastatin	-8.8	-8.2	-7.8	-9.2	-9.9	-8.9
Simvastatin	-10.6	-10.4	-9.0	-9.7	-11.2	-10.2

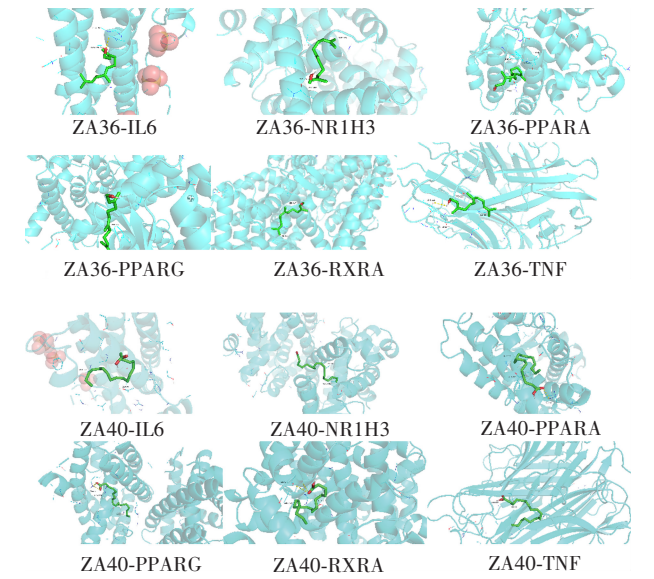


图 6 ZA36、ZA40 与 6 个关键靶点的分子对接模型图
Fig. 6 The molecular docking model diagram of ZA36 and ZA40 with 6 key targets

5 结果与讨论

研究基于 GC-MS 结合网络药理学找寻竹叶花椒挥发油中功能性成分并探讨其潜在的干预高脂血症的作用机制。GC-MS 得出芳樟醇和柠檬烯含量较多,此结果与贵州遵义青花椒挥发油和兴义青花椒精油组分表征结果没有太大差异^[17-19]。竹叶花椒挥发油中的量大活性成分芳樟醇和柠檬烯可能干预高脂血症。据报道,Cheng 等^[20]发现芳樟醇对小鼠体重的增长有着较强的抑制能力,随后,经 3T3-L1 细胞(一种常用的研究脂肪生成调节模型)研究证实,芳樟醇不仅对小鼠脂肪细胞的分化有影响,而且芳樟醇还能使小鼠的血糖值和总胆固醇值保持正常。同时,Cho 等^[21]发现芳樟醇主要通过降低肝脏胆固醇合成标志物 HMGCR 的表达来发挥降胆固醇的作用。此外,LIN L Y 等^[22]经 HepG2 细胞模型证实柠檬烯参与 AMPK-SREBP-PPARS 通路下调脂肪生成相关酶而有利于降低血脂和预防高脂血症的发生。分子对接结果中发现芳樟醇和柠檬烯与关键靶点的结合能并不高,可能的原因是芳樟醇和柠檬烯的靶点与高脂血症疾病靶点的作用关系被研究得较少,未收集到全面的靶点信息,进而未进入 4.2 节所示的交集靶点。未来,芳樟醇和柠檬烯干预高脂血症有待进一步研究。

通过网络药理学得到干预高脂血症的关键靶点 PPARA、RXRA、TNF、NR1H3、PPARG 和 IL-6。过氧化物酶体增值物激活受体(PPARs)是名副其实的“脂肪感应器”,是调节脂质代谢的关键因子,还是人类脂质代谢疾病的治疗靶点。它有 PPARA、PPARG 和 PPAR β 三种亚型。PPARA 主要在棕色脂肪组织中表达,可由一种调节饱腹感的天然脂质油基乙醇酰胺激活,也可由一些降血脂的药物或脂肪酸激活。可减少胆固醇的合成,促进胆固醇分解,从而预防高脂血症的发生^[23-24]。视黄醇 X 受体(RXR α)是一种核受体,由配体活化转录因子 9-顺式视黄酸诱导激活发挥作用,该受体有 RXR α (RXRA)、RXR β (RXRB)和 RXR γ (RXRG)三种亚型^[25]。RXRA 是 PPARA 激活的必需伴侣,共同参与甘油三酯和胆固醇代谢基因的调节而影响高脂血症。而且,RXR 基因与脂质吸收、脂质合成、脂质代谢和脂质稳态密切相关^[26]。肿瘤坏死因子(TNF)可参与多种细胞内信号通路,从而引起细胞凋亡、炎症、免疫等反应^[27]。TNF 能影响胰岛素诱导的机体对葡萄糖的摄取进而控制血糖的迅速升高,还可以在脂肪细胞中诱导 GKAP42 蛋白降解进而诱导对胰岛素的抵抗,减缓脂代谢生物过程^[28]。如今,TNF 蛋白水

平已成为预防、确诊和治疗高脂血症的重要参考指标^[29-30]。氧甾醇受体 α (NR1H3)是肝脏 X 受体的一种亚型,由氧甾醇结合或激活^[31]。该受体主要通过低密度脂蛋白、极低密度脂蛋白和低密度脂蛋白受体相关蛋白 8 的依赖性泛素化肌球蛋白调控轻链结合作用在胆固醇稳态的调节中发挥重要作用^[32]。NR1H3 还可通过磷脂重构酶引发花生四烯酸与内质网膜磷脂酰胆碱的结合,使三酰甘油转移至新生的极低密度脂蛋白颗粒,限制脂质炎症介质的合成来对抗脂质诱导的内质网应激反应和炎症反应^[33],这说明 NR1H3 可进行血脂调节,是治疗高脂血症的潜在靶点。PPARG 与 PPARA 相似,是结合降血脂药物和脂肪酸的受体,一旦被激活,就可控制脂肪酸的过氧化 β 途径,是血糖、血脂稳态的关键调节因子^[34]。白细胞介素-6(IL-6)是与炎症相关的细胞因子,IL-6 的产生有助于防御细菌感染和疾病治疗,但过度的 IL-6 合成与疾病有关。在 Uichi 等^[35]的研究中发现,IL-6 基因在高脂血症和动脉粥样硬化的动物模型中有大量表达,而在 Mònica 等^[36]的小鼠实验中发现,炎症相关的细胞因子 IL-6 的操纵调节机制与啮齿类动物的血脂水平稳态有密切联系。而分子对接结果显示,该 7 个主要活性成分 ZA36、ZA40、ZA13、ZA6、ZA9、ZA14、ZA30 与这 6 个关键靶点有着较强的结合能力,结合能均小于 -7.0 kJ/mol 。由此可见,主要活性成分可能作用于以上关键靶点并使 TNF、IL-6 水平下降,PPARA、RXRA、NR1H3 和 PPARG 水平增加从而发挥干预高脂血症的作用。

综上所述,竹叶花椒挥发油中的量大成分芳樟醇、柠檬烯和主要活性成分金合欢醇、 α -石竹烯和亚油酸等可能通过多靶点、多途径调节血脂异常,起到干预高脂血症的作用。这为后续探索竹叶花椒挥发油干预高脂血症的机制研究提供了思路和依据。

参考文献(References):

- [1] STEWART J, MCCALLIN T, MARTINEZ J, et al. Hyperlipidemia [J]. *Pediatrics In Review*, 2020, 41(8): 393—402.
- [2] 魏连会, 宋淑敏, 董艳, 等. 大麻籽多肽对高脂饮食喂养大鼠血脂的影响[J]. *食品科学*, 2021, 42(11): 161—167.
WEI Lian-hui, SONG Shu-min, DONG Yan, et al. Effect of hemp seed peptide on blood lipids in high-fat diet fed rats[J]. *Food Science*, 2021, 42(11): 161—167.
- [3] 常青, 郑宝东, 张怡, 等. 生姜抗性淀粉对高脂血症大鼠降血脂作用和胆汁酸代谢的影响[J]. *食品科学*, 2022, 43(7): 147—157.
CHANG Qing, ZHENG Bao-dong, ZHANG Yi, et al. Ginger

- resistant starch regulates lipids and bile acid metabolism in hyperlipidemic rats[J]. Food Science, 2022, 43(7): 147—157.
- [4] 李晓, 卢学春, 李雨鑫, 等. 姬松茸多糖提取物对高脂血症大鼠降血脂作用研究[J]. 食品科学技术学报, 2021, 39(2): 56—64.
- LI Xiao, LU Xue-chun, LI Yu-xin, et al. Lipid lowering effect of agaricus blazei polysaccharide extract on hyperlipidemia rats[J]. Journal of Food Science and Technology, 2021, 39(2): 56—64.
- [5] 周孟焦, 何鑫柱, 陈凯, 等. 竹叶花椒中总黄酮提取及富集试验研究[J]. 食品研究与开发, 2021, 42(21): 69—73.
- ZHOU Meng-jiao, HE Xin-zhu, CHEN Kai, et al. Investigation on extraction and enrichment of flavonoids from *Zanthoxylum armatum* DC[J]. Food Research and Development, 2021, 42(21): 69—73.
- [6] 杜若愚, 殷钟意, 吕靖, 等. 花椒籽开发利用研究进展[J]. 重庆工商大学学报(自然科学版), 2008, 93(1): 82—86.
- DU Ruo-yu, YIN Zhong-yi, LV Jing, et al. Research progress and prospect of the development and utilization of *zanthoxylum bungeanum* maxim seeds[J]. Journal of Chongqing Technology and Business University(Natural Science Edition), 2008, 93(1): 82—86.
- [7] 哈立洋, 杨斌, 尹可欢, 等. 竹叶花椒挥发油提取工艺优化及镇痛抗炎活性研究[J]. 中药药理与临床, 2021, 37(3): 127—132.
- HA Li-yang, YANG Bin, YIN Ke-huan, et al. Extraction process optimization of volatile oil from *Zanthoxylum armatum* DC. and study of analgesic and anti-inflammatory activity[J]. Pharmacology and Clinics of Chinese Materia Medica, 2021, 37(3): 127-132.
- [8] 龚普阳, 潘烨华, 郭瑜婕, 等. 基于气相色谱-质谱联用结合网络药理学探究竹叶花椒挥发油抗炎镇痛的作用机制[J]. 中草药, 2021, 52(11): 3296—3305.
- GONG Pu-yang, PAN Yi-hua, GUO Yu-jie, et al. Exploring the anti-inflammatory and analgesic mechanism of the volatile oil from *Zanthoxylum armatum* DC. based on gas chromatography mass spectrometry combined with network pharmacology[J]. Chinese Herbal Medicine, 2021, 52(11): 3296—3305.
- [9] DAHAL D, SUBEDDE A, KHANAL K, et al. In vitro studies on alpha-amylase inhibitory activities of *Zanthoxylum armatum* of Mid-Western Regions of Nepal [J]. Amrit Research Journal, 2021, 2(1): 28—36.
- [10] RYNJAH C V, DEVI N N, KHONG THAW N, et al. Evaluation of the antidiabetic property of aqueous leaves extract of *Zanthoxylum armatum* DC. using in vivo and in vitro approaches[J]. Journal of Traditional and Complementary Medicine, 2018, 8(1): 134—140.
- [11] ALAM F, ASHRAF M. *Zanthoxylum armatum* DC. extracts from fruit, bark and leaf induce hypolipidemic and hypoglycemic effects in mice-in vivo and in vitro study[J]. BMC complementary and alternative medicine, 2018, 18(1): 1—9.
- [12] MUNAWAR I, ABBAS M, AHMED H. The phytochemical valuation and lipid profile impression with *Zanthoxylum armatum* (Rutaceae) through animal-model[J]. Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences, 2021, 34(6): 1822—1833.
- [13] LIAQAT I, RIAZ N, SALEEM Q A, et al. Toxicological evaluation of essential oils from some plants of Rutaceae family[J]. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2018, 12(18): 56—61.
- [14] 毛丽斯, 朱晓红. 网络药理学在中药领域的应用进展[J]. 中医药管理杂志, 2021, 29(13): 98—102.
- MAO Li-si, ZHU Xiao-hong. Application progress of network pharmacology in the field of traditional Chinese medicine[J]. Journal of Traditional Chinese Medicine Management, 2021, 29(13): 98—102.
- [15] 杨晓娟, 胡黄婉茵, 张海珠, 等. 基于网络药理学的气滞胃痛颗粒抗炎镇痛活性作用分析[J]. 中草药, 2019, 50(13): 3094—3106.
- YANG Xiao-juan, HU Huang-wan-yin, ZHANG Hai-zhu, et al. Analysis of anti-inflammatory and analgesic effects of Qizhi Weitong Granules based on network pharmacology[J]. Chinese Herbal Medicine, 2019, 50(13): 3094—3106.
- [16] 苏洁, 周瑞, 王梅, 等. 基于网络药理学的秦七风湿方干预骨性关节炎活性成分及作用机制预测[J]. 中国现代中药, 2022, 24(3): 476—487.
- SU Jie, ZHOU Rui, WANG Mei, et al. Prediction of active ingredients and mechanism of Qinqi rheumatism formula in the intervention of osteoarthritis based on network pharmacology[J]. Modern Chinese Medicine, 2022, 24(3): 476—487.
- [17] 罗庆华, 王炎, 王雨, 等. 青花椒皮挥发油成分 GC-MS 分析[J]. 中国果菜, 2018, 38(11): 37—39.
- LUO Qing-hua, WANG Yan, WANG Yu, et al. GC-MS analysis of volatile oil in green pepper peel[J]. Chinese Fruit and Vegetable Journal, 2018, 38(11): 37—39.
- [18] 马铃, 郭川川, 张峰轶, 等. 花椒精油亚临界流体萃取工艺优化及 GC-MS 分析[J]. 中国酿造, 2022, 41(10): 201—206.
- MA Qian, GUO Chuan-chuan, ZHANG Feng-yi, et al. Optimization of subcritical fluid extraction process and GC-MS analysis of *Zanthoxylum bungeanum* essential oil[J]. China Brewing, 2022, 41(10): 201—206.
- [19] 伍燕, 周中秋, 汪伟, 等. 两种花椒精油成分 GC-MS 分析

- 及活性研究[J]. 广州化工, 2020, 48(24): 111-114, 137.
- WU Yan, ZHOU Zhong-qiu, WANG Wei, et al. GC-MS analysis and activity study of two essential oils from *Zanthoxylum bungeanum*[J]. Guangzhou Chemical Industry, 2020, 48(24): 111-114, 137.
- [20] CHENG B H, SHEEN L Y, CHAN S T. Hypolipidemic effects of S-(+)-linalool and essential oil from *Cinnamomum osmophloeum* ct. linalool leaves in mice[J]. Journal of Traditional and Complementary Medicine, 2018, 8(1): 46—52.
- [21] CHO S Y, JUN H, LEE J H, et al. Linalool reduces the expression of 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase via sterol regulatory element binding protein-2 and ubiquitin-dependent mechanisms [J]. FEBS letters, 2011, 585 (20): 3289—3296.
- [22] LIN L Y, HUANG B C, CHEN K C, et al. Integrated anti-hyperlipidemic bioactivity of whole Citrus grandis [L]. Osbeck fruits—multi-action mechanism evidenced using animal and cell models[J]. Food & function, 2020, 11(4): 2978—2981.
- [23] 裴帅, 曹宁宁, 李晓璇, 等. 中药干预高脂血症相关信号通路的研究进展[J]. 药物评价研究, 2022, 45(1): 177—185.
- PEI Shuai, CAO Ning-ning, LI Xiao-xuan, et al. Research progress of traditional Chinese medicine on signaling pathway associated with hyperlipidemia[J]. Drug Evaluation Research, 2022, 45(1): 177—185.
- [24] 吴希泽, 康健, 李越, 等. 基于“浊气归心, 淫精于脉”理论运用 HPLC-Q-TOF-MS/MS 和网络药理学探讨抵挡汤防治动脉粥样硬化和高脂血症的作用机制[J]. 中国中药杂志, 2023, 48(5): 1352—1369.
- WU Xi-ze, KANG Jian, LI Yue, et al. Mechanism of Didang decoction in prevention of anti-atherosclerosis and hyperlipidemia by HPLC-Q-TOF-MS/MS and network pharmacology based on theory of “nutrients return to heart and fat accumulates in channels”[J]. Chinese Journal of Traditional Chinese Medicine, 2023, 48(5): 1352—1369.
- [25] FRAGKI S, DIRVEN H, FLETCHER T, et al. Systemic PFOS and PFOA exposure and disturbed lipid homeostasis in humans: what do we know and what not?[J]. Critical Reviews In Toxicology, 2021, 51(2): 141—164.
- [26] VAFAEIE F, KAZEMI T, KHOSRAVI S, et al. Association between retinoid X receptor gene variants and dyslipidemia risk in an Iranian Population [J]. Cureus, 2021, 13 (9): 192—200.
- [27] LIU Y, TIE L. Apolipoprotein M and sphingosine-1-phosphate complex alleviates TNF- α -induced endothelial cell injury and inflammation through PI3K/AKT signaling pathway [J]. BMC Cardiovascular Disorders, 2019, 19(9): 1—9.
- [28] GRUNFELD C, FEINGOLD K R. Tumor necrosis factor, cytokines, and the hyperlipidemia of infection[J]. Trends in Endocrinology & Metabolism, 1991, 2(6): 213—219.
- [29] 黄帅, 成鹏, 杨宇, 等. 基于网络药理学探究蒲参胶囊治疗高脂血症的作用机制[J]. 南京中医药大学学报, 2019, 35 (3): 290—296.
- HUANG Shuai, CHENG Peng, YANG Yu, et al. Study on mechanism of pushen capsule for treating hyperlipidemia based on network pharmacology[J]. Journal of Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, 2019, 35(3): 290—296.
- [30] MARTÍNEZ M, FERRE N, GONZALEZ-PERIZ A, et al. 5-Lipoxygenase deficiency reduces hepatic inflammation and tumor necrosis factor α -induced hepatocyte damage in hyperlipidemia - prone ApoE - null mice[J]. Hepatology, 2010, 51(3): 817—827.
- [31] REPA J J, LIANG G, OU J, et al. Regulation of mouse sterol regulatory element-binding protein-1c gene (SREBP-1c) by oxysterol receptors, LXR α and LXR β [J]. Genes & Development, 2000, 14(22): 2819—2830.
- [32] JAKOBSSON T, VENTECLEF N, TORESSON G, et al. GPS2 is required for cholesterol efflux by triggering histone demethylation, LXR recruitment, and coregulator assembly at the ABCG1 locus[J]. Molecular Cell, 2009, 34(4): 510—518.
- [33] SAKURABASHI A, WADA-HIRAIKE O, HIRANO M, et al. CCAR2 negatively regulates nuclear receptor LXR α by competing with SIRT1 deacetylase[J]. The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, 2015, 149(10): 80—88.
- [34] YIN Y, YUAN H, WANG C, et al. 3-Phosphoinositide-dependent protein kinase-1 activates the peroxisome proliferator-activated receptor- γ and promotes adipocyte differentiation [J]. Molecular Endocrinology, 2006, 20 (2): 268—278.
- [35] IKEDA U, IKEDA M, SEINO Y, et al. Interleukin 6 gene transcripts are expressed in atherosclerotic lesions of genetically hyperlipidemic rabbits[J]. Atherosclerosis, 1992, 92(2-3): 213—218.
- [36] TOUS M, RIBAS V, ESCOLA-GIL J C, et al. Manipulation of inflammation modulates hyperlipidemia in apolipoprotein E-deficient mice: a possible role for interleukin-6[J]. Cytokine, 2006, 34(3-4): 224-232.