

# 基于生物信息学探讨黑果枸杞总黄酮治疗非酒精性脂肪肝的作用机制

阿力米江·奥布力塔力甫,马建宝,伊再提·外力,古丽巴哈尔·卡吾力\*

新疆医科大学药学院药剂教研室,乌鲁木齐 830011

**摘要:**本文旨基于生物信息分析揭示非酒精性脂肪肝的关键基因,并基于超高效液相色谱-质谱联用技术(UPLC/MS-MS)、生物信息及分子对接技术识别并探究黑果枸杞总黄酮成分及其治疗非酒精性脂肪肝(NAFLD)的作用机制,为其药效物质基础研究提供参考依据。本研究用 GSE89632 数据集,其中包括 39 名 NAFLD 患者和 24 名健康对照组。Limma 包分析得到 3 375 个差异基因,再通过 WGCNA 分析得到 19 个模块和 95 个最相关基因。黑枸杞总黄酮通过进行定性分析和靶点预测得到 71 个活性成分和 375 个相关基因。疾病基因和成分靶点基因交集得到 24 个基因,用 CytoHubba 筛选出 10 个 Hub 基因。通过 DAVID 数据库得到 KEGG 通路 9 条,GO 分析条目 33 条。分子对接结果表明,大多数黑果枸杞总黄酮成分与关键靶点具有较好的结合力。生存分析结果中 VEGF 与 HCC 的生存分析密切相关。免疫细胞浸润相关性评估分析结果表明,Hub 基因与幼稚 B 细胞、 $\gamma\delta$ T 细胞、单核细胞等 8 种免疫细胞相关。本研究揭示了非酒精性脂肪肝的关键基因、明确了黑果枸杞总黄酮成分、预测了黑枸杞总黄酮成分治疗非酒精性脂肪肝的作用机制并初步验证了其靶点,为深入阐明黑果枸杞总黄酮的药效物质基础及作用机制提供了实验及理论依据。

**关键词:**非酒精性脂肪肝疾病;黑果枸杞总黄酮;生物信息分析;差异表达基因;WGCNA;UPLC/MS-MS

中图分类号:R285

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2021)12-2119-17

DOI:10.16333/j.1001-6880.2021.12.017

## Study on the mechanism of the total flavonoids from *Lycium ruthenicum* Murr. in the treatment of non-alcoholic fatty liver disease based on bioinformatics

ALIMIJIANG · Aobulitalifu, MA Jian-bao, YIZAITI · Waili, GULIBAHAER · Kawuli\*

Department of Pharmacology, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China

**Abstract:** Purport based on bioinformatics analysis revealed the key gene of nonalcoholic fatty liver disease and based on ultra-high performance liquid chromatography-mass spectrometry (UPLC/MS-MS) technology, bioinformatics, and molecular docking to identify and explore the *Lycium ruthenicum* Murr. flavonoids compounds and treatment of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) the mechanism of action, provide a reference basis for the research of its efficacy material base. This study used the GSE89632 dataset, which included 39 patients with NAFLD and 24 control patients. 3 375 differential genes were obtained by Limma packet analysis, and 19 modules and 95 most relevant genes were obtained by WGCNA analysis. Through qualitative analysis and target prediction, 71 active components and 375 related genes were obtained. 24 genes were obtained from the intersection of disease genes and component target genes. Top 10 hub genes were screened out by CytoHubba. Nine KEGG channels and 33 GO analysis items were obtained through David database. Molecular docking results showed that most total flavonoids of *L. ruthenicum* had good binding ability with key targets. The results of survival analysis showed that VEGFA and HCC survival analysis were closely related. The hub gene was associated with eight types of immune cells, including juvenile B cells,  $\gamma\delta$ T cells and monocytes. This study reveals the key gene of nonalcoholic fatty liver disease, has been clear about the *L. ruthenicum* flavonoids ingredients, forecasts the *L. ruthenicum* flavone component in the treatment of non-alcoholic

收稿日期:2021-03-09

接收日期:2021-09-17

基金项目:新疆天然药物活性组分与释药技术重点实验室项目(XJDX1713)

\* 通信作者 Tel:86-991-2210360, E-mail:guli5573@163.com

fatty liver disease and the mechanism of action of preliminary verified its targets, to further clarify the *L. ruthenicum* medicinal material basis and mechanism of total flavonoids provides experimental and theoretical basis.

**Key words:** non-alcoholic fatty liver disease; total flavonoids of *Lycium ruthenicum* Murr.; differentially expressed genes; WGCNA; UPLC/MS-MS; bioinformatics analysis

非酒精性脂肪肝病 (NAFLD) 是肝功能障碍疾病, 可发展为肝硬化, 甚至是肝细胞癌 (HCC)<sup>[1]</sup>。一些研究试图阐明氧化应激、脂肪细胞因子的产生/释放、肝内胰岛素抵抗、脂肪积聚和先天免疫系统激活在 NAFLD 发病机理中的关系。然而, NAFLD 发病机理的内在分子机制尚未完全阐明, 需要更多的研究以提供更深入的了解并探索更有利的治疗靶标<sup>[2]</sup>。

黑果枸杞 (*Lycium ruthenicum* Murr.) 含有的抗氧化活性成分由于其安全性高于合成抗氧化剂而被广泛关注。水溶性抗氧化剂原花青素在内的总黄酮是黑果枸杞的一类重要活性成分<sup>[3]</sup>。随着对黑果枸杞总黄酮成分的一系列药理学研究发现这些成分具有抗氧化、免疫调节、降血脂等药理活性。黑果枸杞总黄酮可降低 ROS 的产生和炎症, 增加肝脏中脂肪酸的氧化, 并减少脂肪酸的合成, 具有还原能力、降

血脂功效、清除 ·OH 的能力和抗脂质体过氧化反应的活性<sup>[4]</sup>。免疫细胞在炎症反应和抑制细胞恶性增殖方面扮演重要角色。研究发现, H-黄酮通过上调 CTRP6 来有效抑制了巨噬细胞的浸润, 炎症和血管斑形成<sup>[5]</sup>。黑果枸杞总黄酮成分具有通过抑制或激活免疫细胞和脂肪细胞之间的相互作用, 减轻脂肪组织中的慢性炎症并积极改善 NAFLD 的可能性。

本文旨把黑果枸杞总黄酮的抗氧化、降血脂、免疫调节等药理活性作为治疗非酒精性脂肪肝的切入点, 通过整合生物信息学分析及各大数据库信息系统地研究黑果枸杞总黄酮治疗非酒精性脂肪肝的药理机制, 为进一步阐明 NAFLD 治疗机制和黑果枸杞类黄酮成分的药理机制提供新的方法与思路 (整体思路如图 1 所示)。

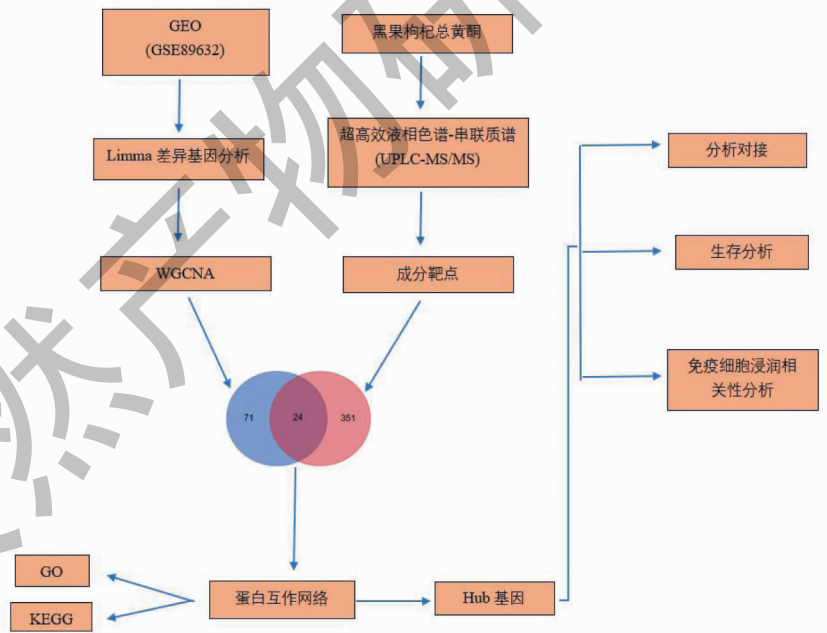


图 1 总技术路线

Fig. 1 General technical route

## 1 材料和方法

### 1.1 NAFLD 的微阵列数据集

我们通过基因表达综合 GEO 数据库 ([https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc =](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=)

GSE89632) 得到 NAFLD 的基因表达数据集。我们使用以下术语系统地搜索了微阵列研究: “脂肪肝”, “非酒精性”, “基因表达”, “智人” 和 “微阵列”。根据以下资格标准筛选数据集: (1) 至少包含

10 个样本;(2)至少包含五个疾病组和至少五个健康对照组;(3)GEO 提供了原始数据或通过阵列进行基因表达谱分析<sup>[6]</sup>。

## 1.2 差异基因分析

首先,我们从 GEO 数据库中下载了微阵列数据集的基因表达矩阵和相关注释文档,并使用相应的注释文档将微阵列探针映射到基因名。如果多个探针映射到同一基因名,则采用平均值。NAFLD 表达微阵列数据集均由分位数标准化。通过使用“limma”(用于微阵列数据的线性模型)R 包确定每个微阵列中 NAFLD 与正常对照组之间的 DEG。 $|\log_2 FC| > 0.5$  和  $P$  值  $< 0.05$  被视为确定 DEG 的临界标准。

## 1.3 WGCNA(加权基因共表达网络分析)

使用“WGCNA”R 软件包构建了 DEG 的加权基因共表达网络。将  $\beta$  的软阈值功率设置为最佳值,生成加权邻接矩阵。然后进行了层次聚类分析。将邻接矩阵转换为拓扑重叠矩阵(TOM),我们使用基于 TOM 差异测量的平均连锁层次聚类对具有相似基因表达模块的基因进行分类,这些基因模块由聚类树的分支和不同颜色表示,构建了模块关系。使用了 Person 方法计算了基因模块与表型之间的相关性,以及确定了与临床特征有关的模块。再筛选出每个模块相关的基因。

## 1.4 超高效液相-质谱

### 1.4.1 仪器设备与试剂

ExionLC 超高效液相、QTrap 6500 + 质谱仪(美国 SCIEX 公司);Heraeus Fresco17 离心机(美国 Thermo 公司);明澈-D 24 UV 纯水仪(美国 Merck Millipore 公司);ACQUITY ULC BEH C<sub>18</sub> 色谱柱(1.7  $\mu\text{m}$ , 2.1 mm  $\times$  150 mm, 美国 Waters 公司);黑果枸杞总黄酮(新疆医科大学实验中心自制);甲醇(67-56-1, LC-MS 级),乙腈(75-05-8, LC-MS 级)(德国 CNW 公司);甲酸(64-18-6, LC-MS 级, 美国 SIGMA 公司)。

### 1.4.2 代谢物的提取

取适量黑枸杞粉末,按照最佳工艺提取黑果枸杞总黄酮:乙醇体积分数 80%、提取时间 60 min、料液比 1 g:15 mL、提取温度 70  $^{\circ}\text{C}$ <sup>[7]</sup>。取 20 mg 样品加入 1.5 mL EP 管中,加入 600  $\mu\text{L}$  提取液(1% 乙酸,75% 甲醇),混合均匀;冰水浴超声提取 30 min,将样品 4  $^{\circ}\text{C}$ , 12 000 rpm 离心 10 min,取上清于 2 mL 进样瓶中;上机检测。

### 1.4.3 色谱-质谱条件<sup>[8]</sup>

色谱柱:UPLC BEH C<sub>18</sub> 色谱柱(1.7  $\mu\text{m}$ , 2.1 mm  $\times$  150 mm);柱温箱温度设为 40  $^{\circ}\text{C}$ ,自动进样器温度设为 8  $^{\circ}\text{C}$ ;流动相为乙腈-0.1% 甲酸水溶液,梯度洗脱:0 ~ 0.50 min,10% 乙腈;0.50 ~ 15.00 min,10%  $\rightarrow$  60% 乙腈;15.00 ~ 16.01 min,60%  $\rightarrow$  98% 乙腈;16.01 ~ 18.00 min,98% 乙腈;18.00 ~ 18.01 min,98%  $\rightarrow$  10% 乙腈;18.01 ~ 20.00 min,10% 乙腈;进样量 2  $\mu\text{L}$ 。

质谱参数:AB Sciex QTrap 6500 + 质谱仪;喷雾电压(IS):+5 000/-4 500 V;鞘气:35 psi;源内温度:500  $^{\circ}\text{C}$ ;离子源气体 1:55 psi;离子源气体 2:60 psi。

### 1.4.4 数据处理

对质谱数据,使用 Skyline 软件对 MRM 数据进行处理。

## 1.5 蛋白互作网络

黑果枸杞总黄酮活性成分基本信息来自中药系统药理学数据库 TCMSP(<https://tcmsp.com/tcm-sp.php>)。化合物靶标是从 Swiss 数据库(<http://swisstargetprediction.ch/>)和 Pharammapper 数据库(<http://lilab-ecust.cn/pharmmapper>)中筛选获取,筛选条件分别为 probability  $> 0$  和 z-score  $> 0.8$ 。再利用 STRING 蛋白互作关系数据库([http://www.string-db.org/newstring.cgi/show\\_input\\_page.pl](http://www.string-db.org/newstring.cgi/show_input_page.pl))下载交集基因互作信息,构建了“靶点基因蛋白互作 PPI”网络模型图。并使用 Cytoscape 软件中的 cytohubba 插件筛选出 PPI(蛋白相互作用网络图)中的关键靶点网络图。

## 1.6 生物信息学注释

导入关键基因到 DAVID 数据库(<https://david.ncifcrf.gov/>),下载 GO 生物进程注释信息和 KEGG 信号通路注释信息,再用在线绘图工具 ImageGP(<http://www.ehbio.com/ImageGP/>)和 R 语言 GOplot 包对数据进行可视化。

## 1.7 分子对接

利用分子对接技术研究黑果枸杞总黄酮中活性成分与相关靶蛋白的相互作用,能够一定程度上说明其活性成分及其靶点的作用机制与结合活性。利用 TCMSP 数据库下载活性成分的结构文件,同时利用数据库 RSCB PDB(<https://www.rcsb.org/>)数据库下载关键靶点的结构文件,将这俩同时导入 Vina 进行分子对接。对小分子和蛋白的结合能力进行打分以评价结合能力。

## 1.8 生存分析

Hub 基因的生存数据由在线网站 GEPIA (<http://gepia2.cancer-pku.cn/#survival>) 分析,该网站已链接到癌症基因组图谱(TCGA)的数据库。利用 TCGA 中的数据,我们根据特定基因的高表达和低表达将 HCC 患者分为两组,并使用 Kaplan-Meier 图分析了总生存率。采用 GEPIA 在线分析肝癌与正常组中 Hub 基因的相对表达量,并探讨从 NAFLD 到 HCC 进展的发病机理。并基于生存分析结果筛选出 Hub 基因中不仅可以作为肝癌预后生物标志物,又可以在黑枸杞总黄酮治疗 NAFLD 过程中起到关键作用的基因。

## 1.9 免疫细胞浸润相关性评估

### 1.9.1 免疫浸润

用 CIBERSORT 算法分析获得的归一化基因表达数据,得到 22 种免疫细胞的比例。根据  $P < 0.05$  筛选样品值,计算样品中每种免疫细胞的百分比。然后,我们使用“ggplot2”软件包对免疫细胞浸润矩阵数据进行 PCA 聚类分析,以绘制二维 PCA 聚类

图,以确定 NAFLD 患者与正常对照组之间的免疫细胞浸润是否存在差异。

### 1.9.2 Hub 基因与浸润性免疫细胞之间的相关性分析

“ggstatsplot”软件包(<https://github.com/IndrajeetPatil/ggstatsplot>)用于对诊断标记和浸润免疫细胞进行 Spearman 相关分析,而“ggplot2”软件包用于可视化结果。

## 2 结果

### 2.1 NAFLD 的微阵列数据集分析结果

根据先前建立的纳入标准,本研究筛选出 GPL14951 平台 2016 年的数据集 GSE89632。在这个数据集中,共有 39 位 NAFLD 患者和 24 位对照。

### 2.2 差异基因分析结果

GSE89632 数据集通过质控、ID 转换和重复基因取平均值等一系列处理之后得到 20 818 个基因表达值。使用 R 软件中的“Limma”软件包筛选出差异基因,得到 1 741 个上调差异基因和 1 634 个下调差异基因(见图 2)。

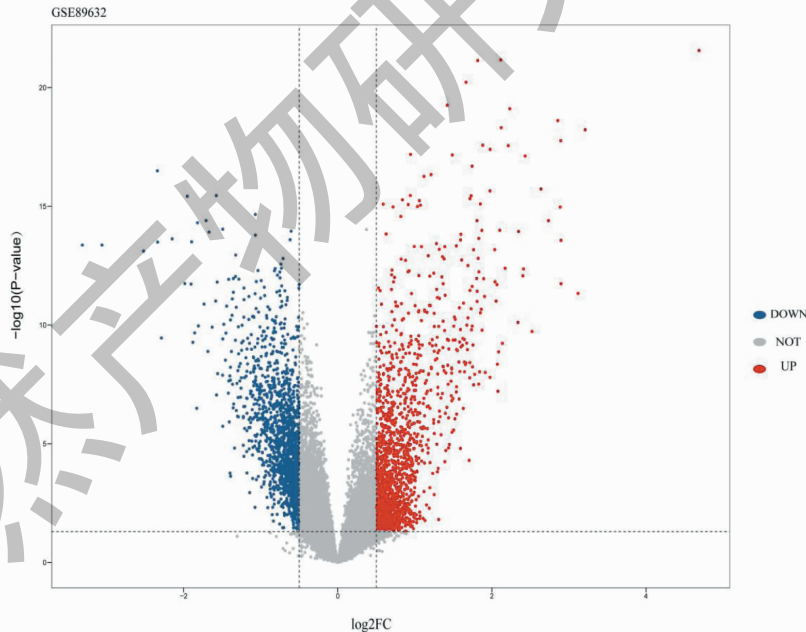


图 2 差异基因火山图

Fig. 2 Volcano map of differential genes

注:蓝色:下调;灰色:无变化;红色:上调。Note: Blue: Down regulation; Gray: No change; Red: Up regulation.

## 2.3 WGCNA 分析结果

通过层次聚类分析,总共确定了 19 个模块,每个模块用不同的颜色表示(见图 3)。为了探索模块特征基因与临床特征之间的相关性,我们绘制了一

个热图(见图 4)。图中的每一列显示相关性和相应的  $P$  值(红色代表正相关,绿色代表负相关。颜色越深,相关系数越强)。我们发现每种临床特征与某些模块密切相关。例如,我们可以从图 4 疾病组

与蓝色模块最相关且正相关,其相关系数为 0.85,  $P$  值为  $2e-18$ 。通过 MM 值筛选出每个模块的五个最相关的基因 (module membership, 是计算基因的表达

量和模块特征值之间的相关系数,相关性越高,说明基因和模块的关联性就越高)<sup>[9]</sup>。表 1 列出了每个模块的五个最相关的基因。

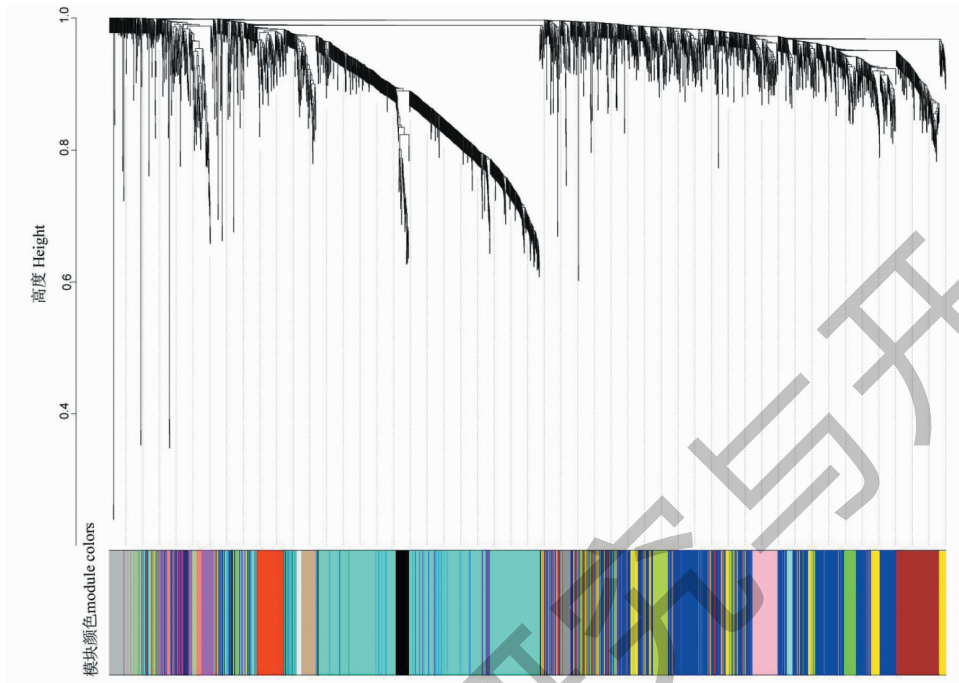


图 3 差异表达基因聚类树状图

Fig. 3 Gene dendrogram of all DEGs clustered based on a dissimilarity measure

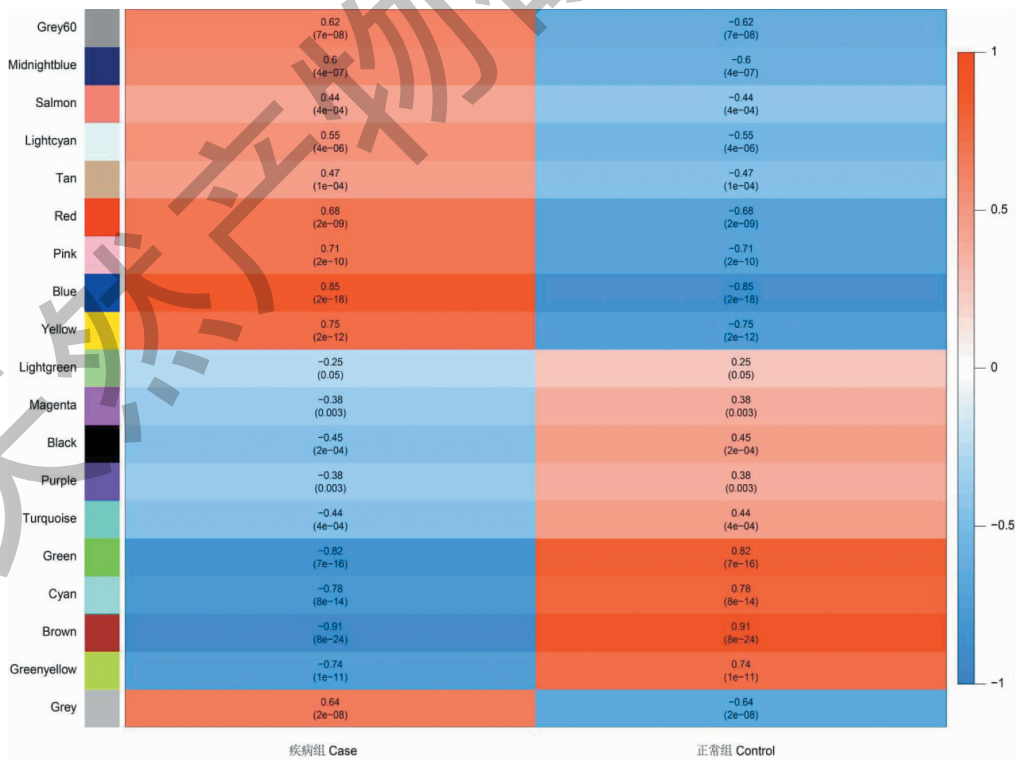


图 4 模块-特征相关图

Fig. 4 Module-feature correlation graph

表 1 每个模块内的最相关前 5 个基因

Table 1 List of top five genes by connectivity within each module

模块名 Module name	最相关 5 个基因 Five of the most relevant genes				
Black	NLRP8	FLJ44124	PODXL	RAX2	F8A2
Blue	TGFB3	SOCS1	CDK6	PGF	GRHL1
Brown	MYC	PTGS2	F3	VIL1	XCR1
Cyan	PCK1	VEGFA	TRMT11	CDC37L1	TUBG1
Green	ARL5B	PIM3	AMD1	KLHL15	ERN1
Greenyellow	MLF1	LCN2	MIDN	YRDC	SPRY2
Grey	CHRD1	CD24	RFC3	LPL	CA12
Grey60	CHD1	AGPAT1	VPS45	HDGF2	IGF1
Lightcyan	RPA4	ATG4C	ASF1A	ZNF33B	CBX1
Lightgreen	SCARNA4	TAPBP	SNORA34	GPLD1	SNORD104
Magenta	MIR744	SNORA73A	SNORD97	SNORA71A	TRAF7
Midnightblue	DHFR	SNORA33	SNORA41	SNORA6	SNORA67
Pink	SPHK2	CCNT1	PIK3R1	PDIK1L	KIF22
Purple	AMY1A	OR4F21	KLK2	OR4F3	OR4F29
Red	CBR1	CABLES1	NR3C2	C3ORF18	AGBL5
Salmon	NTRK2	SNORA25	SNORD27	SNORA28	CSAD
Tan	FBXO8	MMP2	MSH2	SMEK2	XPA
Turquoise	PRAMEF6	SPHK1	AURKB	RFPL1S	POTE2
Yellow	KIAA1161	TMEM42	NQO2	FDFT1	RTP3

## 2.4 超高效液相-质谱分析结果

在负离子模式下,黑果枸杞总黄酮供试品溶液的总离子流图(见图 5A);在正离子模式下,黑果枸杞总黄酮供试品溶液的总离子流图(见图 5B)<sup>[10]</sup>。采用高分辨质谱对数据库中的活性成分匹配,定性

分析黑果枸杞总黄酮的活性成分,得到 92 个化合物<sup>[11]</sup>。并在 TCMSPP 数据库得到各化合物相关信息,以 DL 值大于等于 0.18 作为筛选条件,筛选出 71 个类药性化合物。化合物相关信息见表 2。

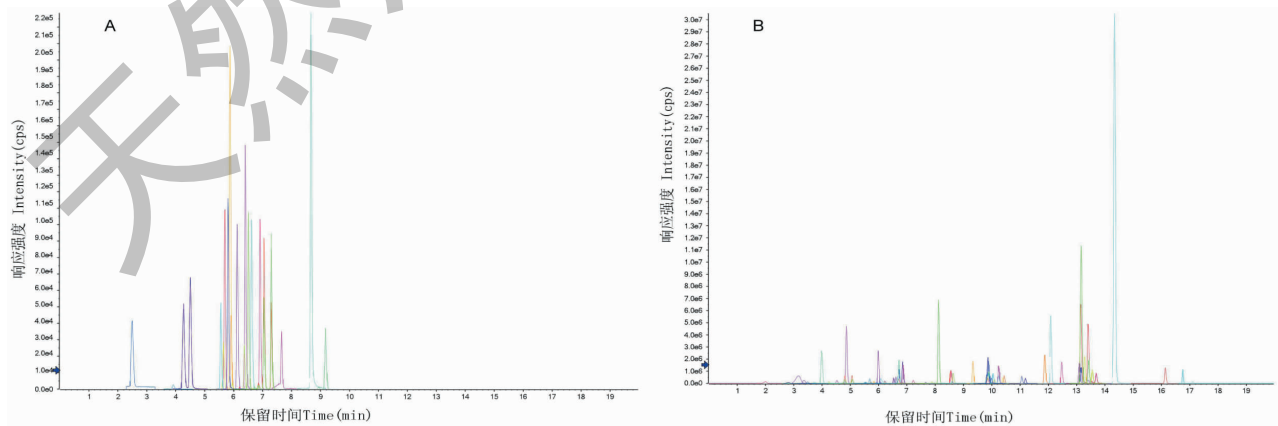


图 5 黑果枸杞总黄酮负离子模式总离子流图 (A) 及正离子模式总离子流图 (B)

Fig. 5 Total ion current diagram in negative ion mode (A) and total ion current diagram in positive ion mode (B) of total flavonoids of *L. ruthenicum*

表 2 化合物成分相关信息

Table 2 Information about the composition of the compound

编号 No.	名称 Name	CAS 号 CAS No.	类药性 DL	生物利用度 OB(%)	保留时间 Retention time(min)	极性 Polarity
1	牡荆素 4'-鼠李糖苷 Vitexin-4'-rhamnosid	32426-34-9	0.8	6.98	5.53	+
2	牡荆素 Vitexin	3681-93-4	0.71	3.05	5.73	+
3	银锻苷 Tiliroside	20316-62-5	0.66	1.94	8.58	+
4	鸢尾黄素 Tectorigenin	548-77-6	0.27	28.41	10.07	+
5	杨芽黄素 Tectochrysin	520-28-5	0.2	9.57	16.74	+
6	斯皮诺素 Spinosin	72063-39-9	0.72	6.31	5.55	-
7	甜橙黄酮 Sinensetin	2306-27-6	0.45	50.56	12.09	+
8	水飞蓟宾 Silibinin	22888-70-6	0.93	0.93	9.71	+
9	金松双黄酮 Sciadopitysin	521-34-6	0.54	0.89	17.1	+
10	夏佛塔苷 Schaftoside	51938-32-0	0.82	4.68	4.72	+
11	芦丁 Rutin	153-18-4	0.68	3.2	5.55	-
12	野漆树苷 Rhoifolin	17306-46-6	0.77	6.68	7.05	+
13	槲皮苷 Quercitrin	522-12-3	0.74	4.04	6.61	-
14	槲皮素 Quercetin	117-39-5	0.28	46.43	8.67	-
15	葛根素 Puerarin	3681-99-0	0.69	24.03	4.04	+
16	原花青素 B2 Procyanidin B2	29106-49-8	0.66	3.01	3.75	+
17	原花青素 B1 Procyanidin B1	20315-25-7	0.66	67.87	2.78	+
18	白杨素 Chrysin	480-40-0	0.18	22.61	13.1	+
19	鹰嘴豆芽素 A Biochanin A	491-80-5	0.24	25.21	13.07	+
20	黄芩苷 Baicalin	21967-41-9	0.75	40.12	7.66	+
21	淫羊藿苷 Icaritin	489-32-7	0.61	41.58	9.33	+
22	金丝桃苷 Hyperoside	482-36-0	0.77	6.94	5.72	+
23	羟基芫花素 Hydroxygenkwanin	20243-59-8	0.27	36.47	11.87	+
24	异荭草素 Isoorientin	4261-42-1	0.76	23.3	4.81	+
25	橙皮苷 Hesperidin	520-26-3	0.67	13.33	7.02	-
26	异荭草素 Hesperetin	520-33-2	0.27	70.31	10.39	+
27	黄豆黄苷 Glycitin	40246-10-4	0.78	22.48	5.1	+
28	黄豆黄素 Glycitein	40957-83-3	0.24	50.48	8.55	+
29	光甘草定 Glabridin	59870-68-7	0.47	53.25	16.14	+
30	芫花素 Genkwanin	437-64-9	0.24	37.13	13.42	+
31	染料木苷 Genistin	529-59-9	0.75	13.35	6.71	+
32	枸橼苷 Poncirin	14941-08-3	0.74	36.55	9.19	-
33	松属素 Pinoembrin	68745-38-0	0.18	64.72	13.43	+
34	荭草苷 Orientin	28608-75-5	0.75	1.79	5.07	+
35	芒果花苷 Ononin	486-62-4	0.78	11.52	8.16	+
36	川陈皮素 Nobiletin	478-01-3	0.52	61.67	13.17	+
37	新橙皮苷 Neohesperidin	13241-33-3	0.69	11.57	7.28	-
38	芸香柚皮苷 Narirutin	14259-46-2	0.75	8.15	6.5	-

续表 2(Continued Tab. 2)

编号 No.	名称 Name	CAS 号 CAS No.	类药性 DL	生物利用度 OB(%)	保留时间 Retention time( min)	极性 Polarity
39	水仙苷 Narcissin	604-80-8	0.65	5.09	6.37	-
40	杨梅苷 Myricitrin	17912-87-7	0.77	5.08	5.64	-
41	杨梅素 Myricetin	529-44-2	0.31	13.75	7.12	+
42	桑色素 Morin	480-16-0	0.27	46.23	7.88	+
43	木犀草素 Luteolin	491-70-3	0.25	36.16	8.57	+
44	山奈酚-3-O-芸香糖苷 Kaempferol-3-O-rutinoside	17650-84-9	0.34	3.05	6.21	+
45	山奈酚 Kaempferol	520-18-3	0.24	41.88	10.08	+
46	山奈苷 Kaempferitrin	482-38-2	0.79	8.16	5.91	-
47	山奈素 Kaempferide	491-54-3	0.27	73.41	13.56	+
48	异鼠李素 Isorhamnetin	480-19-3	0.31	49.6	10.39	+
49	异槲皮苷 Isoquercitrin	21637-25-2	0.77	1.86	5.84	+
50	二氢杨梅素 Dihyromyricetin	27200-12-0	0.31	23.48	4.54	+
51	豆苷 Daidzin	552-66-9	0.73	14.32	4.88	+
52	木犀草苷 Cynaroside	5373-11-5	0.78	7.29	5.99	+
53	金雀异黄酮 Genistein	446-72-0	0.21	17.93	9.85	+
54	高良姜素 Galangin	548-83-4	0.21	45.55	13.55	+
55	漆黄素 Fisetin	528-48-3	0.24	52.6	7.17	+
56	杜鹃素 Farrerol	24211-30-1	0.26	42.65	12.54	+
57	圣草酚 Eriodictyol	552-58-9	0.24	71.79	8.56	+
58	圣草次苷 Eriocitrin	13463-28-0	0.7	4.52	7.02	-
59	黄杞苷 Engletin	572-31-6	0.7	2.56	6.91	-
60	地奥司明 Diosmin	520-27-4	0.66	12.7	6.85	+
61	香叶木素 Diosmetin	520-34-3	0.27	31.14	10.21	+
62	花青素 Cyanidin	13306-05-3	0.24	1.36	5.27	+
63	黄芩素 Baicalein	491-67-8	0.21	33.52	7.66	-
64	扁蓄苷 Avicularin	572-30-5	0.7	2.06	6.41	-
65	紫云英苷 Astragaln	480-10-4	0.74	14.03	6.52	+
66	芹菜素 Apigenin	520-36-5	0.21	23.06	9.85	+
67	穗花杉双黄酮 Amentoflavone	1617-53-4	0.65	2.95	11.18	+
68	金合欢素 Acacetin	480-44-4	0.24	34.97	13.16	+
69	(-)-没食子儿茶素没食子酸酯 (-)-Gallocatechin gallate	4233-96-9	0.77	3.01	4.51	-
70	(-)-表没食子儿茶素没食子酸酯 (-)-Epigallocatechin gallate	989-51-5	0.77	55.09	4.27	-
71	(-)-表儿茶素没食子酸酯(-)-Epicatechin gallate	1257-08-5	0.75	3.01	5.8	-

## 2.5 蛋白互作网络分析结果

通过 Phammapper 数据库和 Swiss 数据库得到化合物相关靶点, 经过去重复、筛选得到 375 个基因。然后, 与 WGCNA 分析得到的 95 个基因取交集得到 24 个关键基因, 这些基因可能是黑枸杞总黄酮治疗非酒精性脂肪肝的关键基因(见图 6)。通过大

量有关报道可以得知, NLRP3、ASCII 和 Casp-1 等炎症相关基因在 NAFLD 发展过程中起着重要作用<sup>[12]</sup>, 所以后面研究中也对这 3 个基因进行分析。再利用 STRING 蛋白互作关系数据库下载交集基因互作信息, 构建了“靶点基因蛋白互作 PPI”网络模型图<sup>[13]</sup>(见图 7)。并使用 Cytoscape 软件中的 Cyto-



Hubba 插件筛选出 PPI( 蛋白相互作用网络图) 中的 10 个关键靶点 F3、MMP2、PGF、NTRK2、PIK3R1、CASP1、NLRP3、SPHK1、PTGS2、VEGFA 等,这 10 个

关键基因作为黑果枸杞总黄酮干预非酒精性脂肪肝疾病的 Hub 基因,对其进行接下来的分子对接、生存分析和免疫浸润分析等一系列研究(见图 8)。

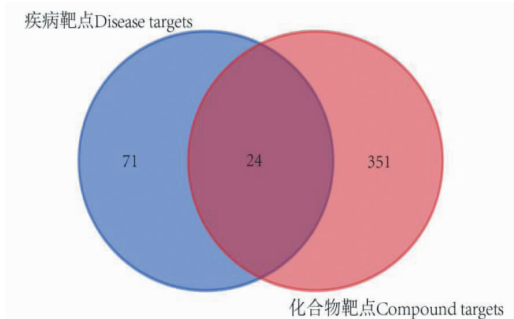


图 6 交集基因韦恩图

Fig. 6 Venn diagram of intersection gene

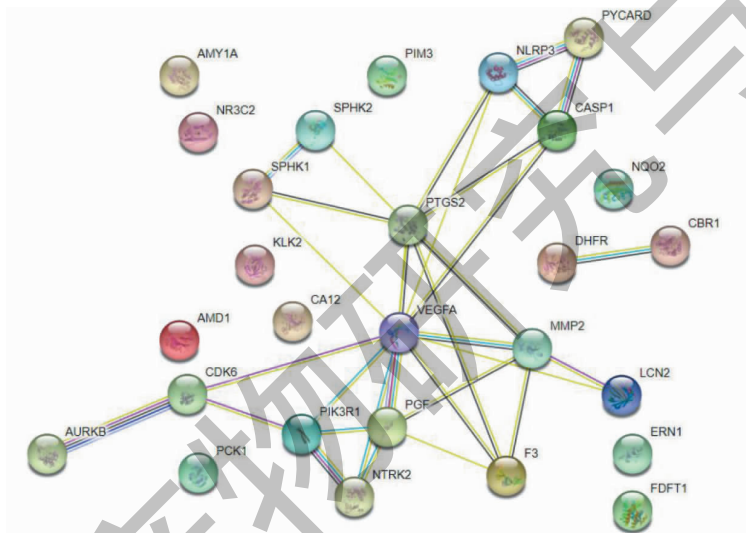


图 7 蛋白互作网络图

Fig. 7 Protein interaction network diagram

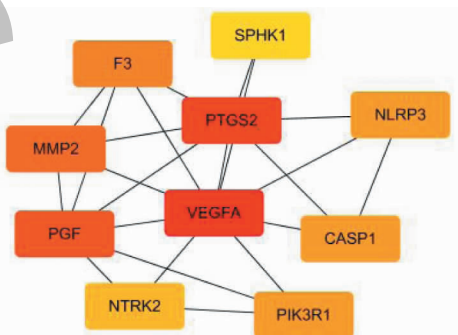


图 8 Hub 基因互作网络图

Fig. 8 Hub genes interaction network diagram

## 2.6 生物信息学注释

### 2.6.1 KEGG 富集结果

将把 27 个作用靶点导入到 David 数据库,得到

9 个关键通路。再把得到的 KEGG 分析数据导入到 Easychart 进行可视化分析(见图 9)。代谢途径 (metabolic pathway) 通路是最显著的代谢通路,可能

是黑果枸杞总黄酮治疗 NAFLD 的最重要的通路,癌症的途径 (pathway in cancer)、鞘脂类信号通路 (sphingolipid signal pathway)、VEGF 信号通路 (VEGF signaling pathway)、PI3K-AKT 信号通路

(PI3K-AKT signal pathway); Fc $\gamma$ -r 介导的吞噬作用 (Fc gamma R-mediated phagocytosis) 通路等可能是较重要的通路。

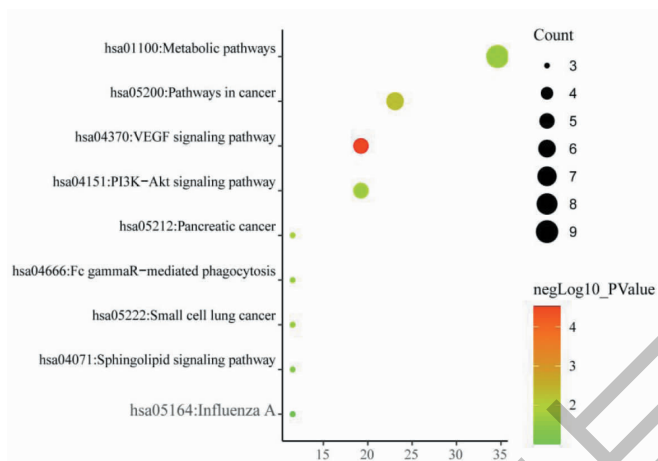


图9 KEGG 富集散点图

Fig. 9 KEGG distribution point map

## 2.6.2 GO 分析结果

将上述筛选出来的 27 个交集基因导入 DAVID 数据库进行 GO 分析,共得到 33 个 GO 条目。黑枸杞总黄酮治疗 NAFLD 与凋亡过程的负调控 (negative regulation of apoptotic process)、应对缺氧 (response to hypoxia)、基因表达正调控 (positive regulation of gene expression)、凋亡过程 (apoptotic process)、NF kappaB 导入细胞核正调控 (positive regulation of NF-kappaB import into nucleus)、白细胞介素-1 $\beta$ 分泌的正向调节 (positive regulation of interleukin-1 beta secretion) 等 19 个生物过程 (BP) 条目密切相关;与鞘氨醇激酶活性 (sphingosine kinase activity)、ATP 结合 (ATP binding)、激酶活性 (kinase activity)、1-磷酸鞘氨醇受体活性 (sphingosine-1-phosphate receptor activity)、镁离子结合 (magnesium ion binding) 等 10 个分子功能 (MF) 条目密切相关;与细胞外空隙 (extracellular space)、细胞溶质 (ytosol)、胞外区 (extracellular region)、NLRP3 炎症体 (NLRP3 inflammasome complex) 等 4 个细胞组分 (CC) 条目密切相关 (见图 10)。

## 2.7 分子对接结果

分子对接技术可研究活性成分与关键靶点的结合能力,有利于验证网络中的关键成分和靶点。将 10 个 Hub 基因靶点与其 71 个活性成分进行分子对接,结合能  $\leq -5.0$  kJ/mol,表明其结合性好<sup>[14]</sup>。分

子对接结果 (见图 11,热图中结合能取绝对值,分数越高说明成分与靶点结合能力大) 表明,大多数黑果枸杞总黄酮成分与关键靶点具有较好的结合力。分别选取 3 组亲和力较强的靶点和成分构建分子对接 3D 模式图 (见图 12)。

## 2.8 生存分析结果

把 10 个 Hub 基因导入到 GEPIA 数据库中得到生存分析结果 (见图 13),其中两个 VEGFA、PGF 与 HCC 的生存分析密切相关 ( $P < 0.05$ ),采用 GEPIA 在线分析肝癌与正常组中 Hub 基因的相对表达量。与正常肝组织相比,肝癌组织中 VEGFA 相对表达量明显下降 ( $P < 0.05$ ),而其他 Hub 基因在两种组织中的表达差异无统计学意义 (见图 14)。VEGFA 基因也是 Hub 基因网络中最关键基因。VEGFA 可能与从 NAFLD 到 HCC 的进展密切相关<sup>[15]</sup>。可能作为肝癌预后生物标志物,也可能是黑枸杞总黄酮治疗 NAFLD 的最关键基因。

## 2.9 免疫细胞浸润相关性评价

### 2.9.1 免疫细胞浸润评估结果

使用 CIBERSORT 算法,我们首先研究了 22 个免疫细胞亚群在 NAFLD 与正常组织之间免疫浸润的差异。图 15 总结了从 29 名正常对照和 34 名 NAFLD 患者获得的浸润结果<sup>[16]</sup>。通过 PCA 发现,来自 NAFLD 患者和正常对照组的组织中免疫细胞的比例显示出明显的群体偏见聚类和个体差异<sup>[17]</sup> (见图 16)。

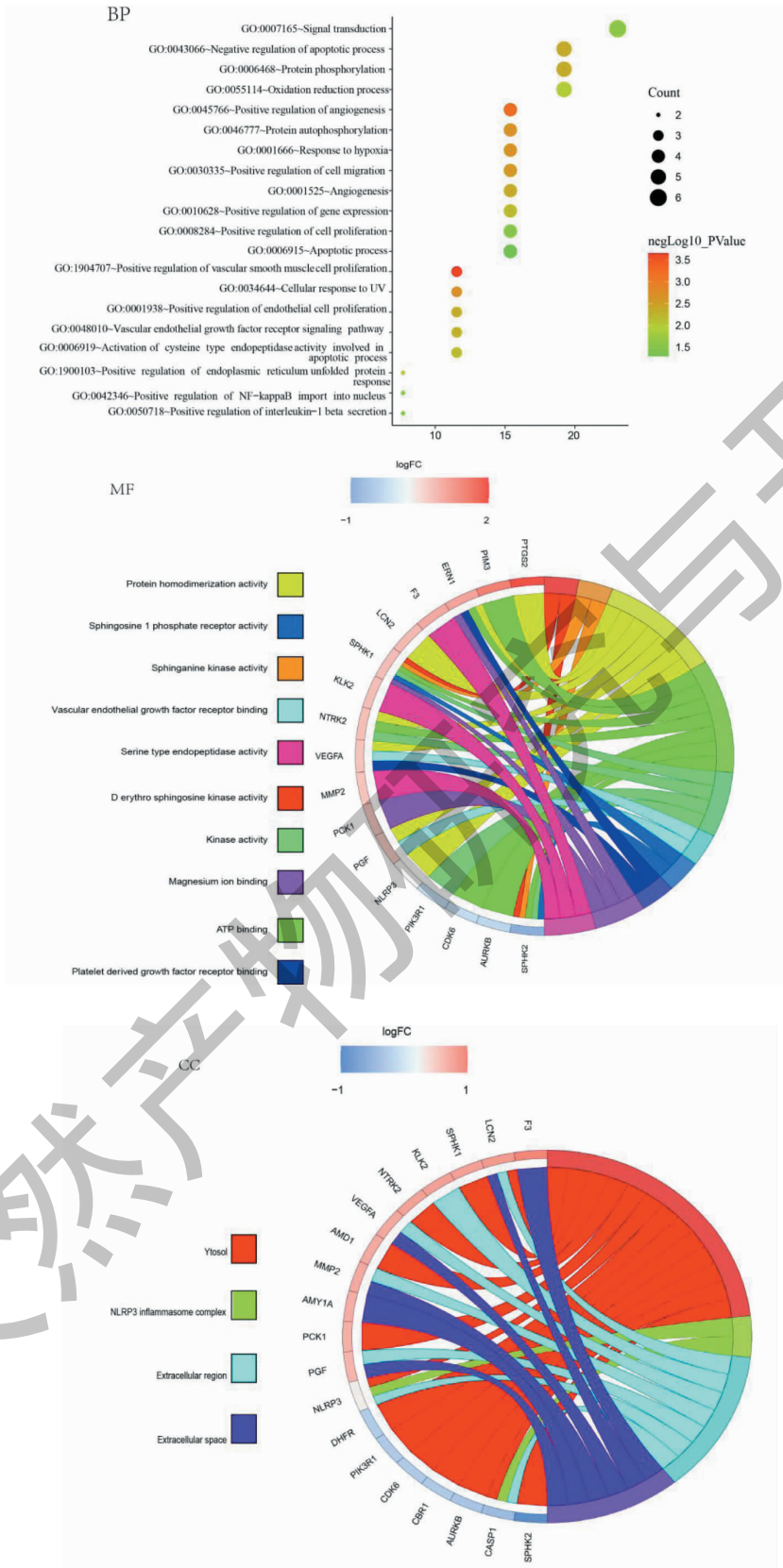


图 10 GO 生物进程分析

Fig. 10 GO biological process analysis

注:BP:生物过程;MF:分子功能类别;CC:细胞成分。Note:BP:Biological process;MF:Molecular function categories;CC:Cell composition.

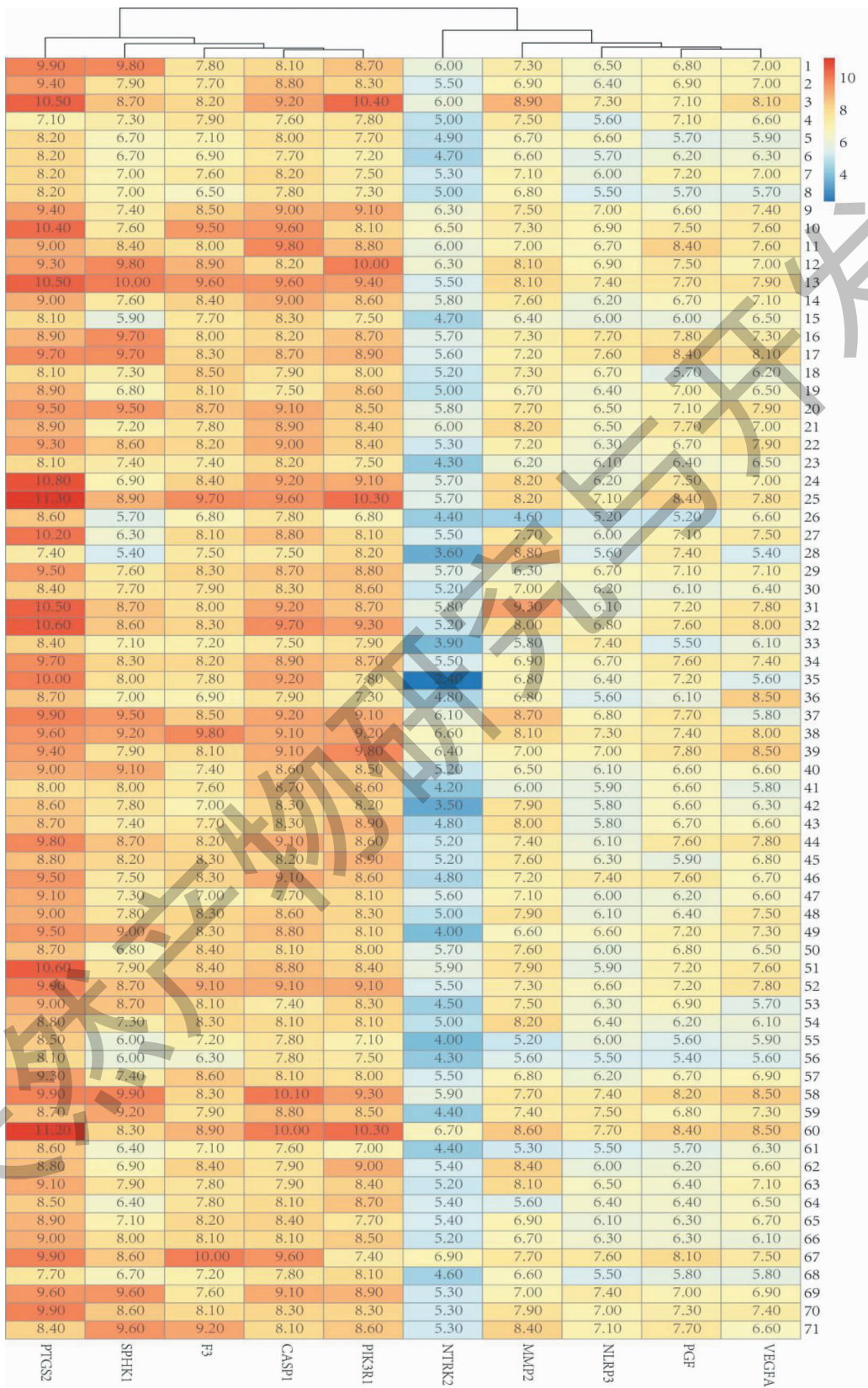


图 11 分子对接结果热图

Fig. 11 Heat map of molecular docking results

注:横坐标:靶点;纵坐标:化合物编号(见表2)。Note:Abscissa;the targets;Ordinate;the compound numbers (As shown in Table 2).

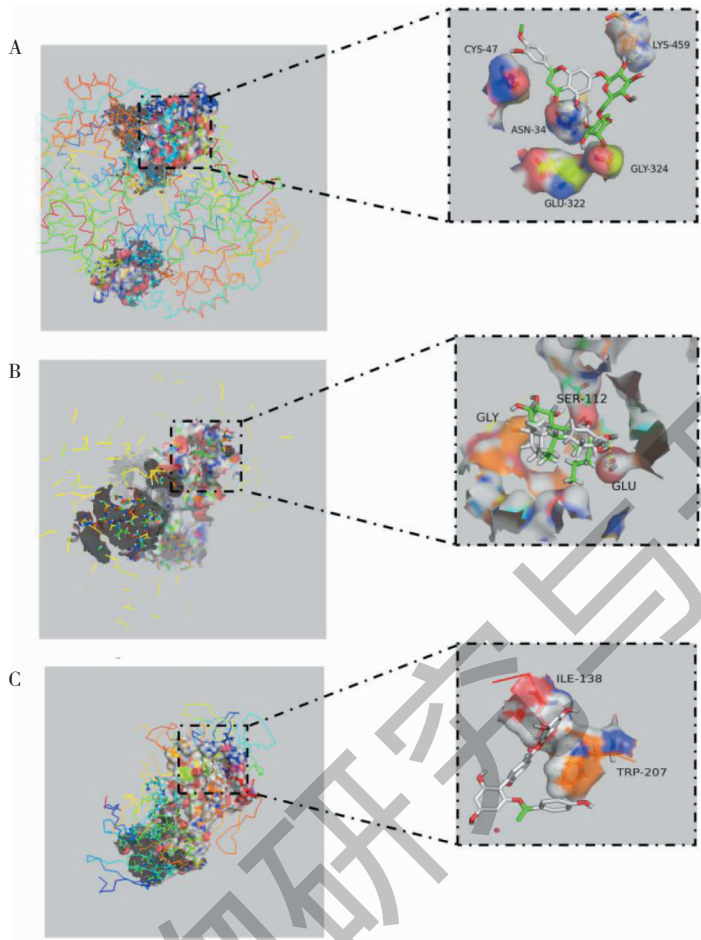


图 12 部分分子对接 3D 图

Fig. 12 3D view of partial molecular docking

注: A: 橙皮苷-PTGS2; B: 圣草次苷-SPHK; C: 穗花杉双黄酮-F3。 Note: A: Hesperidin-PTGS2; B: Eriocitrin-SPHK; C: Amentoflavone-F3.

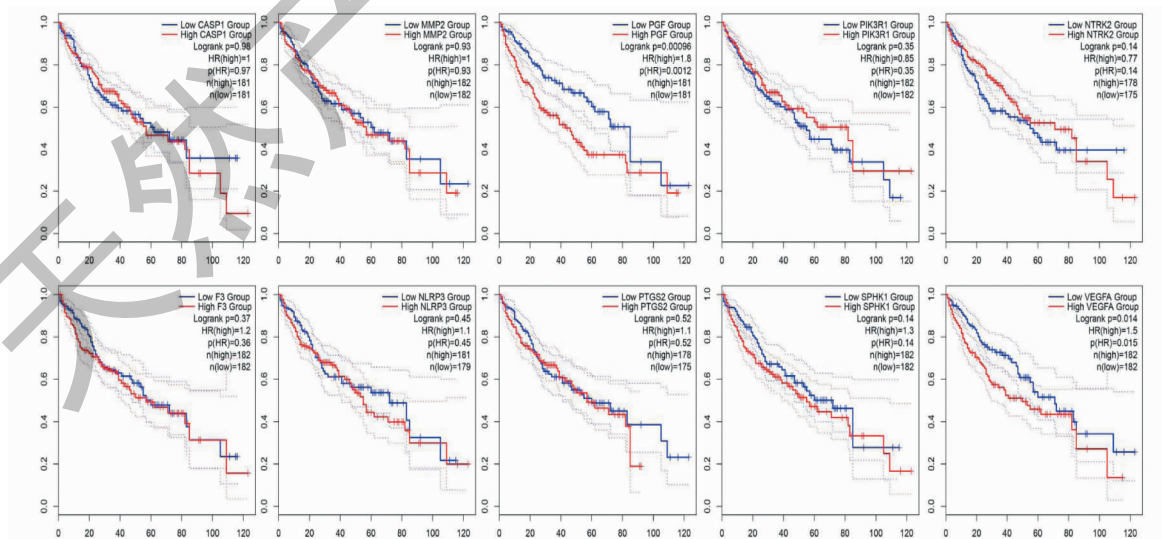


图 13 生存分析图

Fig. 13 Survival analysis diagram

注: 横坐标: 生存时间(月); 纵坐标: 生存概率。 Note: Abscissa: survival time (Month); Ordinate: probability of survival.

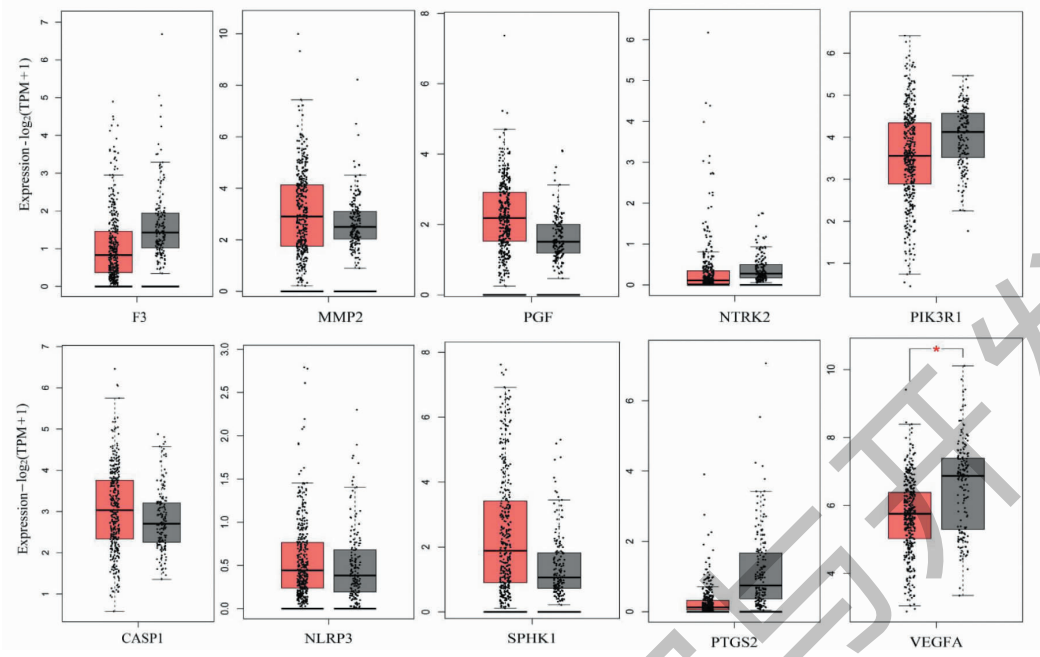


图 14 Hub 基因相对表达量

Fig. 14 Relative expression of Hub gene

注:正常 160 例,肝癌组织 369 例;黑色代表正常组,红色代表肝癌组。Note:160 cases of normal and 369 cases of liver cancer;Black represents the normal group and red represents the liver cancer group.

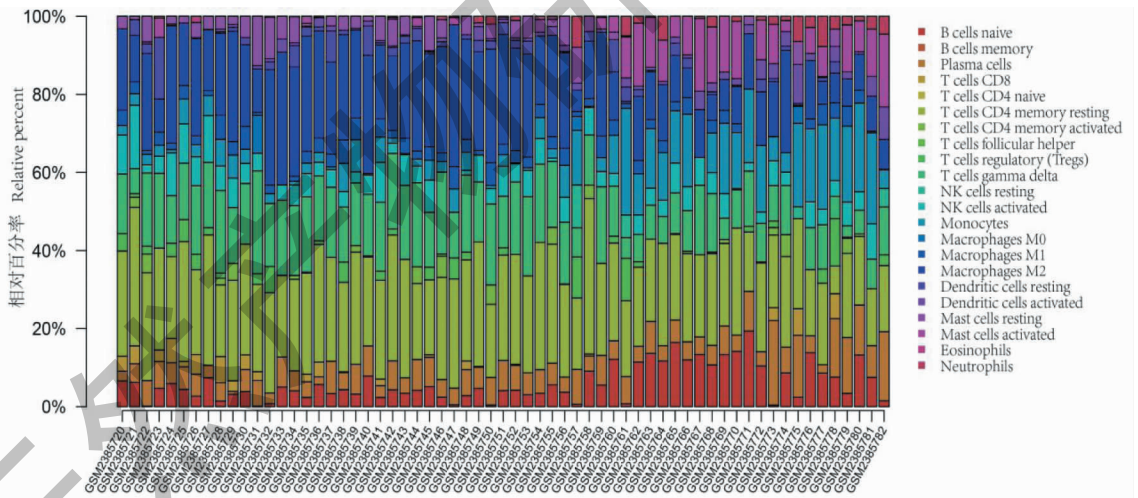


图 15 GSE89632 数据集中 63 个样本中 22 个免疫细胞亚群的相对百分比

Fig. 15 The relative percentage of 22 subpopulations of immune cells in 63 samples from GSE89632 datasets

### 2.9.2 Hub 基因与浸润性免疫细胞之间的相关性分析结果

结果表明 CASP1 与巨噬 M1 细胞( $r = 0.48, P = 0.01$ )正相关、与巨噬 M2 细胞( $r = 0.46, P = 0.04$ )正相关、与激活肥大细胞( $r = -0.47, P = 0.02$ )负相关。F3 与单核细胞( $r = 0.5, P = 0.001$ )正相关、与  $\gamma\delta$ T 细胞( $r = -0.48, P = 0.01$ )负相关。

MMP2 与巨噬 M2 细胞( $r = -0.56, P = 0.001$ )负相关。NLRP3 与巨噬 M1 细胞( $r = 0.45, P = 0.04$ )正相关。NTRK2 与巨噬 M2 细胞( $r = -0.46, P = 0.001$ )负相关。PGF 与巨噬 M2 细胞( $r = -0.53, P = 0.002$ )负相关、与激活肥大细胞( $r = 0.53, P = 0.002$ )正相关、与  $\gamma\delta$ T 细胞( $r = -0.49, P = 0.01$ )负相关。SPHK1 与  $\gamma\delta$ T 细胞( $r = -0.48, P = 0.01$ )负

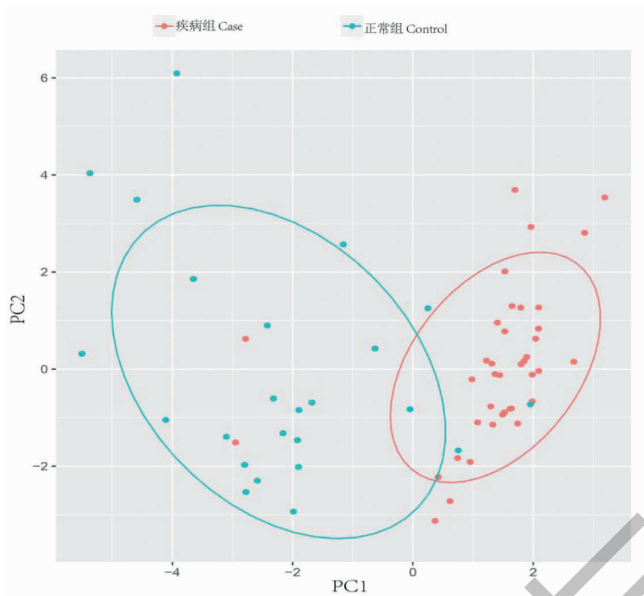


图 16 NAFLD 样品和对照样品之间的免疫细胞浸润的 PCA 图

Fig. 16 PCA cluster plot of immune cell infiltration between NAFLD samples and control samples

相关、单核细胞 ( $r = 0.51, P = 0.004$ ) 正相关、与巨噬 M2 细胞 ( $r = -0.56, P = 0.001$ ) 负相关。PTGS2 与静息肥大细胞 ( $r = -0.51, P = 0.006$ ) 负相关。VEGFA 与幼稚 B 细胞 ( $r = 0.51, P = 0.004$ ) 正相

关、与  $\gamma\delta T$  细胞 ( $r = -0.55, P = 0.001$ ) 负相关、单核细胞 ( $r = 0.52, P = 0.003$ ) 正相关。PIK3R1 与激活肥大细胞 ( $r = -0.53, P = 0.002$ ) 负相关、与静息 CD4 + 记忆 T 细胞 ( $r = 0.5, P = 0.008$ ) 正相关(见图 17)。

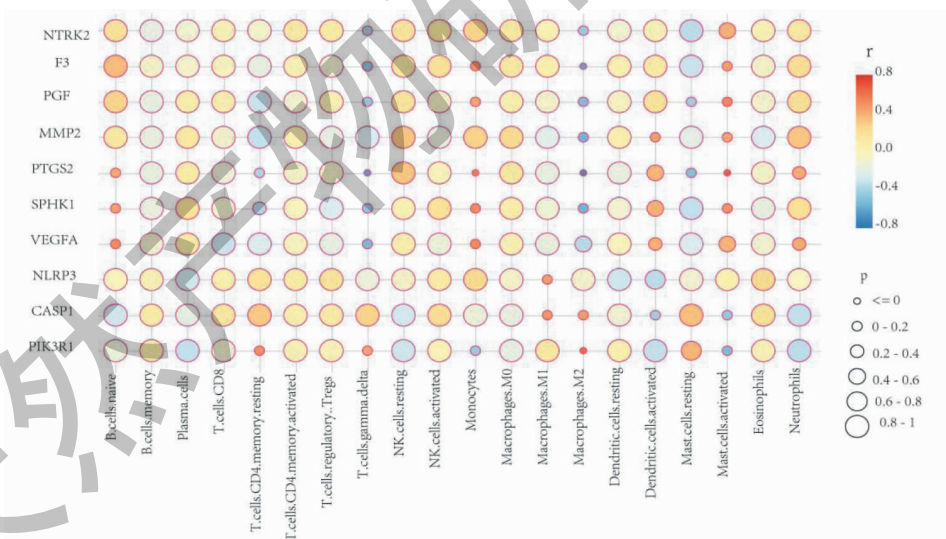


图 17 Hub 基因和浸润的免疫细胞之间的相关性

Fig. 17 Correlation between hub gene and infiltrating immune cells

### 3 讨论与结论

氧化应激和炎症导致高甘油三酸酯血症引起的 NAFLD<sup>[18]</sup>。黑果枸杞包含水溶性抗氧化剂原花青素等多种黄酮类化合物。研究发现黑果枸杞原花青素可显著减轻肝脏中甘油三酸酯的积累,减少炎症,提高 GSH-Px 活性和降低 MDA 水平。可降低 ROS

的产生和炎症,增加肝脏中脂肪酸的氧化,并减少脂肪酸的合成,从而改善由高脂饮食诱导的 NAFLD<sup>[19]</sup>。

在本研究中,我们下载 GEO 数据库上的 NAFLD 微阵列,比较了 NAFLD 和正常对照之间的基因表达谱,得到了 1 741 个上调差异基因和 1 634

个下调差异基因。构建了 WGCNA 基因共表达网络,与得到的活性成分靶标取交集得到 24 个黑枸杞总黄酮治疗 NAFLD 的关键基因。此外,进行功能注释和 PPI 网络构建等多种生物信息分析以了解 Hub 基因的潜在生物学功能。

在功能注释部分,KEGG 通路分析中基因富集最高的通路是代谢途径,而广泛认为代谢功能障碍引起的脂质积聚是引起 NAFLD 的重要原因之一<sup>[20]</sup>。GO 生物进程分析中基因富集到细胞凋亡。有强有力的证据表明,细胞凋亡会导致 NASH 炎症<sup>[21]</sup>。

NLRP3 炎性体活化在 NAFLD 的发病机制中的作用受到了广泛关注<sup>[22]</sup>。在分子对接结果中与 NLRP3 结合评分最高的是原花青素 B2。而早前研究发现,原花青素 B2 显著降低了肺组织中的 NLRP3、ASC 和 caspase-1 信号<sup>[23]</sup>。在人脐静脉内皮细胞(HUVEC)中,原花青素 B2 显著抑制了 NLRP3 炎性小体的激活,并抑制了随后对脂多糖(LPS)的 caspase-1 激活和白介素 IL-1 $\beta$  分泌。原花青素 B2 负调控 NLRP3 的基因表达<sup>[24]</sup>。

我们通过分析 Hub 基因和免疫细胞之间的相关性,发现 Hub 基因与巨噬 M1 细胞、巨噬 M2 细胞、单核细胞、 $\gamma\delta$ T 细胞、激活肥大细胞、静息肥大细胞、幼稚 B 细胞、静息 CD4 + 记忆 T 细胞等免疫细胞密切相关。研究发现,脂质诱导的肝细胞刺激触发含有肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体(TRAIL)的细胞外囊泡的释放,进而激活巨噬细胞以产生 IL-1 $\beta$  和 IL-6<sup>[25]</sup>。此外,在小鼠血液中发现了两个子集的单核细胞,即促炎性单核细胞产生具有促炎或修复表型的巨噬细胞,促炎性单核细胞是脂肪性肝炎的已知驱动程序,总之促炎性单核细胞/巨噬细胞是人类和小鼠脂肪性肝炎的已知驱动器<sup>[26]</sup>。因此,我们推测 Hub 基因通过激活或抑制这几个免疫细胞来参与 NAFLD 的发生和发展。

总之,我们通过生物信息分析、UPLC/MS-MS 等方法揭示了非酒精性脂肪肝病相关的核心基因并探讨了黑果枸杞总黄酮治疗 NAFLD 的作用机制。尽管先前的一些研究结果与我们的分析结果相符,但该研究结果的可靠性仍需要进一步的实验验证。

#### 参考文献

1 Geh D, Manas DM, Reeves HL. Hepatocellular carcinoma in non-alcoholic fatty liver disease-a review of an emerging challenge facing clinicians [J]. *Hepatobiliary Surg Nutr*,

2021,10(1):59-75.  
 2 Han MAT, Yu Q, Tafesh Z, et al. Diversity in NAFLD; a review of manifestations of nonalcoholic fatty liver disease in different ethnicities globally [J]. *J Clin Transl Hepatol*, 2021,9(1):71-80.  
 3 Zhang YH, Fang YT, Cui XM. Research advance on chemical constituents and pharmacological activities of *Lycium Ruthenicum* Murr [J]. *Mod Chem Res*(当代化工研究),2020(16):145-147.  
 4 Zhang G, Chen SS, Zhou W, et al. Rapid qualitative and quantitative analyses of eighteen phenolic compounds from *Lycium ruthenicum* Murr by UPLC-Q-Orbitrap MS and their antioxidant activity[J]. *Food Chem*,2018(2):150-156.  
 5 Zhuo X, Tian Y, Wei Y, et al. Flavone of *Hippophae* (H-flavone) lowers atherosclerotic risk factors via upregulation of the adipokine C1q/tumor necrosis factor-related protein 6 (CTRP6) in macrophages[J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2019,83:2000-2007.  
 6 Ye JZ, Lin YS, Wang Q, et al. Integrated multichip analysis identifies potential key genes in the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis [J]. *Front Endocrinol*, 2020, 11: 601745.  
 7 Gulibahar K, Gao XL, Chang ZY, et al. Optimization of extraction process and antioxidant activity of total flavonoids from *Lycium ruthenicum* Murr [J]. *J Agri Sci* (江苏农业科学),2017,45(22):213-217.  
 8 Xue Y, Xu XS, Yong L, et al. Analysis of anthocyanins and flavonoids in blueberry extract by UPLC-TOF MS [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发),2018,30:731-735.  
 9 McDonough JE, Kaminski N, Thienpont B, et al. Gene correlation network analysis to identify regulatory factors in idiopathic pulmonary fibrosis [J]. *Thorax*, 2019, 74 (2): 132-140.  
 10 Chen H, Qiu Q. Determination of chemical constituents of *Sophora flavescens* Alt by ultra-high liquid chromatography-high resolution mass spectrometry [J]. *Guangxi Tradit Chin Med* (广西中医药),2019,42(5):72-74.  
 11 Cao M, Liu Y, Jiang W, et al. UPLC/MS-based untargeted metabolomics reveals the changes of metabolites profile of *Salvia miltiorrhiza* Bunge during Sweating processing [J]. *Sci Rep*,2020,10(1):19524.  
 12 Dong Z, Zhuang Q, Ye X, et al. Adiponectin inhibits NLRP3 inflammasome activation in nonalcoholic steatohepatitis via AMPK-JNK/ErK1/2-NF- $\kappa$ B/ROS signaling pathways [J]. *Front Med (Lausanne)*,2020,7:546445.  
 13 Song YX, Wang XY, Wang FJ, et al. Identification of four genes and biological characteristics of esophageal squamous cell carcinoma by integrated bioinformatics analysis [J].



- Cancer Cell Int, 2021, 21: 123.
- 14 Emon NU, Alam S, Rudra S, et al. Antidepressant, anxiolytic, antipyretic, and thrombolytic profiling of methanol extract of the aerial part of *Piper nigrum*: *In vivo*, *in vitro*, and *in silico* approaches [J]. Food Sci Nutr, 2021, 9: 833-846.
  - 15 Cai C, Song X, Yu C. Identification of genes in hepatocellular carcinoma induced by non-alcoholic fatty liver disease [J]. Cancer Biomark, 2020, 29(1): 69-78.
  - 16 Cai W, Li H, Zhang Y, et al. Identification of key biomarkers and immune infiltration in the synovial tissue of osteoarthritis by bioinformatics analysis [J]. PeerJ, 2020, 17(8): e8390.
  - 17 Zeng F, Zhang Y, Han X, et al. Predicting nonalcoholic fatty liver disease progression and immune deregulations by specific gene expression patterns [J]. Front Immunol, 2021, 26(11): 609900.
  - 18 Tao S, Yang Y, Li J, et al. Bixin attenuates high-fat diet-caused liver steatosis and inflammatory injury through Nrf2/PPAR $\alpha$  signals [J]. Oxid Med Cell Longev, 2021: 6610124.
  - 19 Lu K, Wang J, Yu Y, et al. *Lycium ruthenicum* Murr alleviates nonalcoholic fatty liver in mice [J]. Food Sci Nutr, 2020, 8: 2588-2597.
  - 20 Wu L, Xie Y. Effect of NF- $\kappa$ B on the pathogenic course of non-alcoholic fatty liver disease [J]. J Centr South Univ: Med Sci (中南大学学报:医学版), 2017, 42: 463-467.
  - 21 Yuan S, Pan Y, Zhang Z, et al. Amelioration of the lipogenesis, oxidative stress and apoptosis of hepatocytes by a novel proteoglycan from *Ganoderma lucidum* [J]. Biol Pharm Bull, 2020, 43: 1542-1550.
  - 22 Yen IC, Lin JC, Chen Y, et al. *Antrodia Cinnamomea* attenuates nonalcoholic steatohepatitis by suppressing NLRP3 inflammasome activation *in vitro* and *in vivo* [J]. Am J Chin Med, 2020, 48: 1859-1874.
  - 23 Jiang Y, Yang W, Gui S. Procyanidin B2 protects rats from paraquat-induced acute lung injury by inhibiting NLRP3 inflammasome activation [J]. Immunobiology, 2018, 223: 555-561.
  - 24 Yang HX, Xiao L, Yuan Y, et al. Procyanidin B2 inhibits NLRP3 inflammasome activation in human vascular endothelial cells [J]. Biochem Pharmacol, 2014, 92: 599-606.
  - 25 Dembek A, Laggai S, Kessler SM, et al. Hepatic interleukin-6 production is maintained during endotoxin tolerance and facilitates lipid accumulation [J]. Immunobiology, 2017, 222: 786-796.
  - 26 Nahum MS, Alejandro VR, Carlos CC, et al. The cellular pathways of liver fibrosis in nonalcoholic steatohepatitis [J]. Ann Trans Med, 2020, 8(6): 400.

## 木犀草素通过介导 SOX2 蛋白稳定性减弱耐紫杉醇食管癌细胞的癌细胞干性

食管癌是一种常见的恶性肿瘤,食管癌患者的5年生存率仅为10%~15%。紫杉醇(PTX)是治疗食管癌的一线化疗药物,在一定程度上能够缩小肿瘤大小并诱导细胞死亡。但是,长期应用化疗药物可能导致肿瘤耐药,引发肿瘤转移。癌细胞在耐药过程中能够获得癌症干细胞(CSCs)的特征,即具有无限的自我更新能力、增殖和分化潜能,且可诱导转移和侵袭。上皮-间充质转化(EMT)被认为是转移过程中的一个关键步骤,与各种癌症类型中的CSCs状态密切相关。之前的研究发现,PTX耐药的食管癌可诱导EMT进展。因此,消除癌干细胞干性将是对抗食管癌耐药性和转移的有效策略。木犀草素(luteolin)是一种天然黄酮类化合物,据报道可抑制前列腺癌、结直肠癌和肺癌的癌症干性、转移、血管生成和EMT进展。然而木犀草素对食管耐药癌细胞的肿瘤干细胞、转移、EMT进展和潜在机制的影响知之甚少。

来自郑州大学药学院的王淙及其团队探讨了木犀草素如何影响耐药食管癌细胞的肿瘤干细胞特性和迁移。该团队发现,木犀草素通过下调SOX2蛋白的表达显著减弱PTX抗性癌细胞的干细胞样特性。进一步的研究表明,木犀草素可以抑制PI3K/AKT通路以降低AKT(S473)和UBR5的磷酸化水平,UBR5是一种促进SOX2降解的泛素E3连接酶。此外,木犀草素还通过阻断EMT抑制PTX耐药癌细胞的迁移和侵袭。重要的是,木犀草素抑制食管PTX耐药癌细胞的致瘤能力,并且在体内没有显示出明显的毒性。因此,木犀草素有可能成为一种有前途的抗耐药性食管癌治疗药物。相关研究发表在《Pharmacological Research》杂志上。

胡乃华编译自: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1043661821005235>

原文标题: Luteolin attenuates cancer cell stemness in PTX-resistant oesophageal cancer cells through mediating SOX2 protein stability